

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JENIFER PENDIUK GONÇALVES

**COMPLEXOS NATURAIS ALTAMENTE DILUÍDOS ALTERAM PARÂMETROS DE
MALIGNIDADE EM MELANOMA MURINO**

CURITIBA

2016

JENIFER PENDIUK GONÇALVES

**COMPLEXOS NATURAIS ALTAMENTE DILUÍDOS ALTERAM PARÂMETROS DE
MALIGNIDADE EM MELANOMA MURINO**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Camargo de Oliveira
Coorientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Gonçalves, Jenifer Pendiuk

Complexos naturais altamente diluídos alteram parâmetros de malignidade em melanoma murino. / Jenifer Pendiuk Gonçalves. – Curitiba, 2016.

109 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Carolina Camargo de Oliveira

Co-orientador: Edvaldo da Silva Trindade

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Melanoma I. Título II. Oliveira, Carolina Camargo de III. Trindade, Edvaldo da Silva IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 616.99477

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Profa. Dra. Carolina Camargo de Oliveira
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Simone Martins de Oliveira
UNICESUMAR

Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer
Depto. Bioquímica - UFPR

Suplente:

Prof. Dr. Francisco Filipak Neto
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir a mestrand **Jenifer Pendiuk Gonçalves**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Complexos naturais altamente diluídos alteram parâmetros de malignidade em melanoma murino", são de parecer favorável à APROVAÇÃO da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular. A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 24 de Março de 2016

Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Coord. do Programa de Pós-Graduação
Em Biologia Celular e Molecular
Matr./UFPR 104132

Centro Politécnico
Rua Heráclito Domingos dos Santos s/n | Jardim das Américas
Caixa Postal: 19031 | CEP: 81.531-980 | Curitiba | Paraná | Brasil
Fone: 55.41.3361-1676

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, obrigada família, por todo o esforço para me dar a oportunidade de estudar. Hoje é uma das coisas que mais gosto de fazer e ainda tenho o prazer de poder contribuir para os avanços de um ramo da ciência que ajuda tantas pessoas ao redor do mundo. Obrigada por ouvir com amor e paciência todas as vezes que disse que não poderia ir visita-los porque precisava trabalhar e ainda continuarem me apoiando incondicionalmente. Vocês são demais!

Ao Gustavo, por tudo, simplesmente. Está sempre ao meu lado, concorda com as minhas loucuras, me faz companhia quando trabalho demais, discute ciência no café da manhã, me faz rir o tempo todo, tornando a vida sempre mais feliz.

À Caro, por ser essa amiga e orientadora incrível. Virginiana que é, sempre exige um pouquinho mais de mim, fazendo com que nosso trabalho em equipe fique cada vez melhor e ainda torna o ambiente de trabalho de todos mais leve e divertido. Me sinto muito privilegiada nesse mundo acadêmico em que vivemos, pois simplesmente só tenho a agradecer à minha orientadora.

Ao Edvaldo, pela dedicação como coorientador, pelo carinho e confiança no meu trabalho e também por permitir financeiramente que esse trabalho fosse realizado.

À Mallu e à Vivi, por serem essas meninas maravilhosas, sempre dispostas a me ajudar sem nunca reclamar e por me ensinarem todos os dias como é ser uma minorientadora. Sem vocês muito desse trabalho não teria sido realizado. Suas lindas!

A todos os colegas de laboratório, que fazem a convivência diária sempre divertida, mas também construtiva. Todos vocês foram muito importantes para a construção desse trabalho, seja científica ou emocionalmente. Em especial à Dani, que dedicou muito tempo e paciência na recuperação do protocolo de cultivo das nossas células, permitindo que esse e vários outros trabalhos fossem realizados com confiança.

À Simone, por aceitar fazer parte da minha banca, mas além disso, por me ensinar muito do que eu sei hoje cientificamente, por me ceder o lugar de “sabichona” do lab e até mesmo seu apartamento.

À Prof^a Sheila e ao Prof Francisco por aceitarem tão prontamente serem avaliadores do meu trabalho.

À Farmácia Homeoterápica de Curitiba, por preparar e ceder as soluções altamente diluídas utilizadas nesse e em outros trabalhos do nosso grupo.

Ao Israel, pelo cuidado e dedicação na operação do microscópio confocal, o que nos permite obter imagens lindas das nossas células.

Aos Profs Lucélia e Sílvia, por gentilmente abrirem as portas dos seus laboratórios para utilização de equipamentos e empréstimo de reagentes que facilitaram a realização desse trabalho.

Ao laboratório da Profª Helena Nader, por gentilmente permitir a realização dos ensaios de quantificação de ácido hialurônico.

À Luciane, da Molecular Devices, pela atenção e disponibilidade para analisar os ensaios de triagem de alto rendimento.

À Ana Paula, do ICC, por gentilmente nos ceder a linhagem de células Balb/3T3 usada nesse trabalho.

Ao laboratório do Prof Sílvia Zanata, por gentilmente nos ceder o anticorpo para detecção de α -SMA.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

Ao CNPq, CAPES e Fundação Araucária, pelo apoio financeiro.

RESUMO

O melanoma compreende a maior causa de morte por câncer de pele, pois é altamente refratário às terapias existentes. Células tumorais apresentam mutações somáticas responsáveis pela ativação constitutiva de vias de sinalização que normalmente seriam ativadas pela interação de fatores de crescimento com seus receptores. Uma vez ativas em células de melanoma, essas vias levam à proliferação contínua das células e, conseqüentemente, à progressão da doença ao promover escape da morte celular, expressão de oncogenes, invasividade, angiogênese e metástase. Além disso, essas células apresentam alterações em diversas moléculas de adesão a outras células e à matriz extracelular, o que contribui para seu fenótipo agressivo e invasivo. As células cancerosas, apesar de suas características fenotípicas adquiridas por alterações genéticas e epigenéticas, não agem sozinhas no desenvolvimento da doença. Os fibroblastos associados ao câncer estão envolvidos em todos os processos que levam às transformações fisiológicas que permitem às células cancerosas tornarem-se malignas, como a produção de moléculas de matriz extracelular e de proteínas de remodelação dessa matriz, fornecendo sinais para a sobrevivência, invasão e proliferação das células cancerosas. Terapias para pacientes portadores de câncer, que utilizam altas diluições de compostos naturais, apresentam evidências de eficácia, levando à melhoria do bem-estar. Nosso grupo de pesquisa tem obtido resultados interessantes com complexos naturais altamente diluídos, denominados M1 ou M8, em especial em melanoma, com estudos *in vitro* e *in vivo*. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo entender de que forma M1 ou M8 atuam sobre os mecanismos moleculares de células de melanoma murino *in vitro*, resultando na redução de suas características metastáticas, bem como avaliar se induzem algum tipo de alteração no processo de comunicação entre essas células cancerosas e fibroblastos. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com M1 foi capaz de reduzir a marcação das células B16-F10 para N-caderina e aumentar para CD54, enquanto M8 reduziu as marcações para N-caderina e também CD44. Ambos tratamentos não alteraram a marcação para NG2, LAMP-1 e β -catenina, bem como a ativação de AKT. Ambos tratamentos com M1 ou M8 reduziram a capacidade das células B16-F10 de formar colônias a partir de si. Quando as células B16-F10 foram cocultivadas com fibroblastos Balb/3T3 não houve alteração na marcação para CD44 e α -SMA após ambos os tratamentos. M8 foi capaz de inibir a síntese/liberação de ácido hialurônico no sobrenadante da cocultura, bem como a marcação para N-caderina no extrato celular. Tanto M1 quanto M8 não causam alterações nos padrões de proliferação e viabilidade quando aplicados sobre os fibroblastos isolados. A atividade da MMP-2 secretada no sobrenadante das culturas não foi alterada para B16-F10, porém mostrou-se reduzida na cocultura. Com esse trabalho foi possível demonstrar que os tratamentos com M1 e com M8, além de seguros possuem atividade seletiva modulando as características tumorais, levando-as a um fenótipo de menor malignidade.

Palavras-chave: B16-F10. Altas diluições. Moléculas de adesão. Comunicação celular. Microambiente tumoral.

ABSTRACT

Melanoma comprises the leading cause of death from skin cancer, especially because it is highly refractory to existing therapies. Tumor cells exhibit somatic mutations responsible for constitutive activation of signaling pathways that would normally be activated by the interaction of growth factors with their receptors. Once active in melanoma cells, these pathways lead to continued cells proliferation and, therefore, the disease progression by promoting cell death escape, oncogene expression, cell survival, invasiveness, angiogenesis and metastasis. Moreover, these cells present changes in several adhesion molecules to other cells and to the extracellular matrix that contributes to their aggressive and invasive phenotype. Cancer cells, despite their phenotypic characteristics acquired by genetic and epigenetic alterations, do not act alone in the development of the disease. Cancer-associated fibroblasts are involved in all the processes leading to physiological changes that allow cancer cells to become malignant, such as the production of extracellular matrix molecules, and its remodeling, providing survival signals, and promoting cancer cells invasion and proliferation. Therapies for cancer patients using high dilutions of natural compounds present evidence of efficacy leading to improved welfare. Our research group has obtained interesting *in vitro* and *in vivo* results with highly diluted natural complexes, called M1 and M8, particularly in melanoma studies. Thus, this study aimed to understand how M1 and M8 act on the molecular mechanisms of murine melanoma cells *in vitro*, resulting in reduced metastatic characteristics and also assess whether they induce changes in the communication process between these cancerous cells and fibroblasts. The results showed that treatment with M1 was able to reduce B16-F10 cells labeling for N-cadherin and increase to CD54, while M8 reduced N-cadherin and CD44 labeling. No alterations were observed on NG2, LAMP-1, β -catenin, and AKT activation; on the other hand, B16-F10 colony formation capacity was decreased by both treatments. When B16-F10 cells were co-cultured with Balb/3T3 fibroblasts there were no changes in CD44 and α -SMA labeling after both treatments. M8 was able to inhibit hyaluronic acid synthesis/release by cells to coculture supernatant, as well as N-cadherin cell expression. Fibroblasts proliferation and viability were not altered by any treatment. The activity of MMP-2 secreted into the cultures supernatant was not changed for B16-F10 alone but was reduced in coculture with fibroblasts. The current work demonstrated that treatments with M1 and M8 are safe and have selective activity modulating tumor characteristics, leading to a less malignant phenotype.

Keywords: B16-F10. High dilutions. Adhesion molecules. Cell communication. Tumor microenvironment.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	2
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1.	CÂNCER.....	6
2.1.1.	TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL.....	7
2.1.2.	O MICROAMBIENTE TUMORAL	8
2.1.3.	MELANOMA.....	10
2.1.3.1.	VIAS DE SINALIZAÇÃO EM MELANOMA	12
2.1.3.2.	TRATAMENTOS VIGENTES PARA MELANOMA.....	14
2.1.3.3.	ALTAS DILUIÇÕES E CÂNCER	15
3.	JUSTIFICATIVA.....	18
4.	OBJETIVOS	20
5.	MATERIAL E MÉTODOS	22
5.1.	PREPARAÇÃO DOS CNADs - M1 E M8.....	22
5.2.	CULTIVO CELULAR.....	22
5.3.	TRATAMENTO IN VITRO	23
5.4.	IMUNOMARCAÇÕES PARA CITOMETRIA DE FLUXO E TRIAGEM DE ALTO RENDIMENTO.....	24
5.5.	IMUNOMARCAÇÕES PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA CONFOCAL.....	25
5.6.	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS CELULARES TOTAIS	25
5.7.	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	26
5.8.	IMUNOMARCAÇÕES POR WESTERN BLOT	26
5.9.	ZIMOGRAMA EM GELATINA POR SDS-PAGE	27
5.10.	ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM ALGINATO	28
5.11.	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO	28
5.12.	ENSAIO DE MORTE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	29

5.13.	QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO	29
5.14.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
PARTE I		31
6.1.	MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE PROGRESSÃO DO MELANOMA	31
6.1.1.	M8 REDUZ A MARCAÇÃO DE B16-F10 PARA CD44	32
6.1.2.	TANTO M1 QUANTO M8 NÃO ALTERAM A MARCAÇÃO DE PGCS4/NG2 EM CÉLULAS B16-F10 APÓS TRATAMENTO	35
6.1.3.	M1 E M8 REDUZEM MARCAÇÃO DE B16-F10 PARA N-CADERINA	37
6.1.4.	TANTO M1 QUANTO M8 NÃO ALTERAM A MARCAÇÃO DE LAMP-1 EM CÉLULAS B16-F10 APÓS TRATAMENTO	41
6.1.5.	M1 AUMENTA A MARCAÇÃO DE CD54 EM CÉLULAS B16-F10 APÓS TRATAMENTO	42
6.2.	MOLÉCULAS ENVOLVIDAS EM VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULARES IMPORTANTES PARA A PROGRESSÃO DO MELANOMA	45
6.2.1.	TANTO M1 QUANTO M8 NÃO ALTERAM A ATIVAÇÃO DE AKT EM CÉLULAS B16-F10 APÓS TRATAMENTO	45
6.2.2.	TANTO M1 QUANTO M8 NÃO ALTERAM A MARCAÇÃO PARA B-CATENINA EM CÉLULAS B16-F10 APÓS TRATAMENTO	47
6.3.	ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DA MMP-2.....	50
6.3.1.	TANTO M1 QUANTO M8 NÃO ALTERAM A ATIVIDADE DA MMP-2 SECRETADA POR B16-F10 APÓS TRATAMENTO.....	50
6.4.	FORMAÇÃO DE COLÔNIAS	52
6.4.1.	TANTO M1 QUANTO M8 REDUZEM A CAPACIDADE DAS CÉLULAS B16-F10 DE FORMAR COLÔNIAS EM MATRIZ DE ALGINATO.....	52
PARTE II		56
6.5.	CARACTERÍSTICAS DE INTEGRIDADE CELULAR	57

6.5.1. O TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> COM M1 OU M8 NÃO ALTERA O PADRÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DE FIBROBLASTOS MURINOS BALB/3T3.....	57
6.5.2. O TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> COM M1 OU M8 NÃO ALTERA A VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS MURINOS BALB/3T3.....	57
6.6. MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO PARA CAFs	60
6.6.1. OS TRATAMENTOS COM M1 OU M8 NÃO ALTERAM A MARCAÇÃO PARA A-SMA NO EXTRATO PROTEICO DA COCULTURA ENTRE B16-F10 E BALB/3T3.....	60
6.7. DETECÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO E MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE CELULAR	61
6.7.1. O TRATAMENTO COM M8 INIBE A PRODUÇÃO/SECREÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO PELAS CÉLULAS DA COCULTURA ENTRE B16-F10 E BALB/3T3	61
6.7.2. OS TRATAMENTOS COM M1 OU M8 NÃO ALTERAM A MARCAÇÃO DAS CÉLULAS DA COCULTURA ENTRE B16-F10 E BALB/3T3 PARA CD44.....	64
6.7.3. O TRATAMENTO COM M8 REDUZ A MARCAÇÃO DAS CÉLULAS DA COCULTURA ENTRE B16-F10 E BALB/3T3 PARA N-CADERINA.....	65
6.8. ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DA MMP-2.....	67
6.8.1. TANTO M1 QUANTO M8 NÃO ALTERAM A ATIVIDADE DA MMP-2 LIBERADA NO SOBRENADANTE DA COCULTURA DE B16-F10 E BALB/3T3 APÓS TRATAMENTO	67
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
8. CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXOS.....	84
ANEXO 1. PROTOCOLO PARA MARCAÇÃO DE B16-F10 OU COCULTURA DE B16-F10 + 3T3 PARA CD44 (MARCAÇÃO EXTERNA) – CITOMETRIA DE FLUXO	84
ANEXO 2. PROTOCOLO PARA MARCAÇÃO DE B16-F10 PARA N-CADERINA (MARCAÇÃO INTERNA) – CITOMETRIA DE FLUXO	84
ANEXO 3. PROTOCOLO PARA MARCAÇÃO DE B16-F10 PARA LAMP-1 (MARCAÇÃO EXTERNA) – CITOMETRIA DE FLUXO	85
ANEXO 4. PROTOCOLO PARA MARCAÇÃO DE B16-F10 PARA CD54 (MARCAÇÃO EXTERNA) – CITOMETRIA DE FLUXO	86

ANEXO 5. PROTOCOLO PARA MARCAÇÃO DE B16-F10 PARA NG2 (MARCAÇÃO INTERNA) – CITOMETRIA DE FLUXO	86
ANEXO 6. PROTOCOLO PARA MARCAÇÃO DE B16-F10 PARA BETA-CATENINA E FALOIDINA - CONFOCAL.....	87
ANEXO 7. PROTOCOLO PARA MARCAÇÃO DE B16-F10 PARA E E N-CADERINAS - CONFOCAL	88
ANEXO 8. PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS CELULARES TOTAIS.....	89
ANEXO 9. PROTOCOLO PARA DOSAGEM DE PROTEÍNAS USANDO O PIERCE™ BCA PROTEIN ASSAY KIT.....	89
ANEXO 10. PROTOCOLO PARA WESTERN BLOT.....	90
ANEXO 11. PROTOCOLO PARA IMUNOMARCAÇÃO DE ACTINA POR WESTERN BLOT	94
ANEXO 12. PROTOCOLO PARA IMUNOMARCAÇÃO DE AKT POR WESTERN BLOT	95
ANEXO 13. PROTOCOLO PARA IMUNOMARCAÇÃO DE P-AKT POR WESTERN BLOT	97
ANEXO 14. PROTOCOLO PARA IMUNOMARCAÇÃO DE B-CATENINA POR WESTERN BLOT	98
ANEXO 15. PROTOCOLO PARA IMUNOMARCAÇÃO DE N-CADERINA POR WESTERN BLOT.....	99
ANEXO 16. PROTOCOLO PARA IMUNOMARCAÇÃO DE A-SMA POR WESTERN BLOT	100
ANEXO 17. PROTOCOLO PARA ZIMOGRAMA EM GELATINA POR SDS-PAGE	102
ANEXO 18. PROTOCOLO PARA ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM ALGINATO.....	106
ANEXO 19. PROTOCOLO PARA ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR POR COLORAÇÃO COM CRISTAL VIOLETA	107
ANEXO 20. PROTOCOLO PARA MARCAÇÃO CELULAR COM ANEXINA V E 7AAD	107
ANEXO 21. PROTOCOLO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO NO SOBRENADANTE DAS CULTURAS CELULARES.....	108

1. INTRODUÇÃO

A homeopatia constitui um método terapêutico criado pelo médico alemão Christian Friedrich Samuel Hahnemann em 1796. A ciência homeopática é baseada em conceitos bastante sólidos, como a Lei da semelhança, a experimentação no homem são, o uso de doses mínimas ou infinitesimais e o uso do medicamento único. A diluição e a dinamização das soluções foram estabelecidas por Hahnemann com o intuito de diminuir a toxicidade das substâncias utilizadas e liberar a força medicamentosa latente das mesmas. (BRASIL, 2011). O nosso grupo de pesquisa tem utilizado a denominação “altamente diluído” para as soluções previamente chamadas de “homeopáticas”. Esse termo foi estabelecido pelo Grupo Internacional de Pesquisa em Infinitesimal (GIRI) e a partir de então foi padronizado para os pesquisadores membros dessa comunidade. (WAISSE, 2012). Alguns complexos naturais altamente diluídos (CNADs) vêm sendo testados pelo nosso grupo há aproximadamente quinze anos, dentre eles os que denominamos M1 e M8, que são objetos de estudo desse trabalho.

Os CNADs compreendem uma combinação de vários ingredientes diferentes tidos como úteis para determinados sintomas ou doença. Observações clínicas confirmam o sucesso desse tratamento, que aparenta permitir que o próprio organismo responda positivamente a diversas condições patológicas. Compostos preparados seguindo técnicas homeopáticas são usados rotineiramente para tratamentos desde resfriados, febres, acne e lesões cutâneas, até enfermidades mais complexas, como infecções por patógenos e neoplasias.

A eficácia de altas diluições de substâncias biologicamente ativas na modificação da resposta imunológica tem sido avaliada através de diferentes abordagens teóricas e experimentais. Estudos do nosso laboratório mostraram efeito ativador do tratamento *in vitro* com CNADs sobre células da linhagem monocítica (LOPES et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006, 2008), além de ação geral no sistema imunológico, melhorando o funcionamento de células envolvidas na resposta celular e humoral. Esse efeito propicia proteção ao organismo contra infecções, ao mesmo tempo que modula a resposta inflamatória, uma vez que os CNADs reduzem a produção de citocinas inflamatórias quando simulada uma infecção, sem citotoxicidade para os macrófagos. (OLIVEIRA et al., 2011).

Em 2005, Sato e colaboradores observaram que o tratamento por 19 dias de camundongos portadores de sarcoma-180 com um CNAD de *Aconitum napellus* 11dH, *Bryonia alba* 18dH, *Thuja occidentalis* 19dH, *Arsenicum album* 19dH e *Lachesis muta* 18dH

promoveu redução no tamanho dos tumores e menor ulceração cutânea. Houve 100% de sobrevivência, com 30% dos animais tratados apresentando regressão total do tumor. Os animais tratados produziram menor quantidade de TNF- α , o que pode ter sido responsável pela ausência de perda de peso. Foi encontrado maior número de leucócitos circulantes, aproximando-se do normal, e também maior quantidade de células NK (do inglês *natural killer*) nos animais tratados, proporcionando-lhes melhor defesa contra o tumor. Análise histológica mostrou ainda maior infiltração de células inflamatórias e fibrose ao redor do tumor, formando uma cápsula que delimita a massa invasiva do mesmo. Esse trabalho mostrou que o tratamento com o CNAD age regulando os leucócitos de forma a compensar os efeitos da doença e conter a progressão tumoral. (SATO et al., 2005).

A partir de então nosso grupo de pesquisa passou a estudar especificamente dois complexos naturais altamente diluídos, os quais foram denominados M1 e M8. Esses complexos são produzidos a partir da mistura de 15 e 11 ingredientes, respectivamente, de origem mineral, animal e vegetal. Sendo assim, foi realizado um estudo *in vitro* onde linfócitos cocultivados com macrófagos na presença de M8 apresentaram maior expressão de CD25 (um marcador de ativação de células T). Assim, foram capazes de diminuir a densidade de células de melanoma B16-F10 e favorecer sua lise, mostrando melhora da resposta imunológica contra células cancerosas promovida pelo tratamento. Posteriormente, verificou-se que essas células de melanoma, quando expostas *in vitro* ao tratamento por 48 horas, apresentaram menor capacidade de adesão e invasão, características importantes no processo de metástase. (GUIMARÃES et al., 2009). Posteriormente, realizou-se um estudo *in vivo* utilizando modelo murino de metástase pulmonar induzido por injeção de células de melanoma B16-F10. Nesse trabalho demonstrou-se que o tratamento dos animais com M8 por inalação promoveu redução da metástase nos pulmões, com menor quantidade e tamanho dos nódulos. O tratamento também reduziu a expressão de perlecan - um proteoglicano de heparan sulfato que favorece angiogênese, crescimento e invasão de células cancerosas - no ambiente extracelular. (GUIMARÃES et al., 2010).

O tratamento com M1 por inalação apresentou resultados muito semelhantes utilizando o mesmo modelo de metástase pulmonar, reduzindo a quantidade e o tamanho de nódulos nos pulmões. As células desses nódulos apresentaram menor marcação para Ki67 (marcador de proliferação celular) e aumento na marcação para β -catenina (envolvida em vias de controle da proliferação) e massiva marcação para caspase-3 ativa (indutor de morte celular). Em modelo de tumor sólido subcutâneo também induzido por

injeção de células de melanoma B16-F10, o tratamento com M1 reduziu o crescimento tumoral (acompanhado da redução na marcação para Ki67) e a angiogênese, o que explica a redução do crescimento tumoral. Foi também detectado aumento na quantidade de áreas de morte celular no interior do tumor, sem prejuízo aparente à saúde dos animais. Esse mesmo trabalho demonstrou que o tratamento *in vivo* com M1 não alterou as quantidades de diversas células do sistema imunológico nos pulmões. (FERRARI DE ANDRADE et al., 2016).

O tratamento *in vivo* com M1, tanto no modelo de metástase pulmonar, quanto no tumor sólido subcutâneo (ambos de melanoma), mostrou redução na expressão de COX-2, um marcador de inflamação, bem como de ácido hialurônico (AH), um glicosaminoglicano da matriz extracelular (MEC), intimamente alterado em processos tumorais e relacionado à angiogênese. Nesse mesmo trabalho buscou-se avaliar os efeitos do tratamento com M1 em tumor subcutâneo já estabelecido (tratamento após o volume tumoral de 300 mm³), uma vez que nos estudos anteriores o tratamento era iniciado 24 horas após a injeção das células de melanoma. Foi observada redução na velocidade de crescimento do tumor, que pode ser explicada pela baixa taxa de proliferação celular (avaliada pela marcação por PCNA) e maior expressão de p53, sugerindo indução de apoptose das células cancerosas. Portanto, alterações em marcadores inflamatórios poderiam contribuir para o efeito antimelanoma do CNAD M1. (LECK, 2013).

Tendo em vista os promissores resultados obtidos nos modelos *in vivo*, buscou-se compreender de que forma os complexos M1 e M8 interferiam no fenótipo das células de melanoma murino B16-F10 *in vitro*, levando à diminuição do crescimento tumoral observado nos trabalhos anteriores. Dessa forma, foram feitos ensaios funcionais com essas células na presença dos CNAD, constatando que M1 e M8 não são citotóxicos para as células de melanoma e também não alteram sua capacidade proliferativa. Entretanto, promovem o desbalanço da produção de espécies reativas derivadas de oxigênio e nitrogênio, resultando na redução da capacidade migratória das células de melanoma. Observou-se também redução da funcionalidade dos transportadores ABC após tratamento com M1, os quais são responsáveis pelo transporte de fármacos para fora da célula, mostrando uma possível sensibilização das células cancerosas para quimioterápicos. Foram observadas ainda alterações em moléculas chave para o desenvolvimento tumoral. Os tratamentos levaram à redução da expressão gênica de metaloproteases (MMP2, MMP9 e MT1-MMP), sugerindo a redução da capacidade invasiva dessas células. Além disso, verificou-se redução da produção/expressão gênica

de carboidratos envolvidos no processo tumoral, como: ácido hialurônico, proteoglicano de condroitim sulfato 4 (PGCS4), sindecans 1 e 2, glipicam-3 e perlecan, bem como enzimas que modulam proteoglicanos de heparam sulfato (heparanases) e ácido hialurônico (hialuronidasas). Esses carboidratos e enzimas que os modificam estão envolvidos em vias de sinalização que levam a muitos processos relacionados à metástase, dentre eles, migração e invasão. (POTRICH, 2014). Esse trabalho mostrou várias alterações que podem estar relacionadas com vias de sinalização atuantes em células cancerosas, fornecendo indícios dos mecanismos que podem culminar nos efeitos antitumorais dos CNADs M1 e M8.

Como demonstrado anteriormente, acreditava-se que os efeitos antitumorais de medicamentos homeopáticos eram devidos apenas à ativação do sistema imunológico, e há realmente fortes evidências de que essa ativação seja um dos mecanismos responsáveis pelo resultado antitumoral. Outra hipótese levantada recentemente foi a de que poderiam atuar sobre o processo de formação de novos vasos sanguíneos, levando indiretamente à redução do crescimento tumoral por escassez de nutrientes e oxigenação. Entretanto, hoje sabemos que esses compostos e CNADs podem também atuar diretamente sobre células cancerosas, o que poderia tornar o tratamento ainda mais eficiente ao atingi-las diretamente, além de estimular o próprio organismo a combatê-las. Nesse trabalho dedicamos especial atenção às células de melanoma, pois essas apresentam mecanismos muito eficientes de driblagem e camuflagem perante o sistema imunológico. Foram analisadas moléculas de adesão, prováveis vias de sinalização e processos de comunicações intercelulares afetados pelos tratamentos, na tentativa de elucidar o mecanismo de diminuição dos tumores encontrado previamente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CÂNCER

O câncer, termo genérico para um grande grupo de doenças, está dentre as dez causas de morte mais frequentes no mundo. As Américas do Sul e Central, juntamente com Ásia e África somam 70% das mortes causadas por câncer mundialmente. Qualquer parte do corpo pode ser afetada, sendo essa patologia resultante da combinação de alguns fatores como: genética individual, idade, exposição a carcinógenos físicos (como raios ultravioleta e radiação ionizante), químicos (componentes do tabaco e contaminantes da água e alimentos) e biológicos (infecções por alguns vírus, bactérias e parasitas). (WHO, 2013, 2014b). Alterações herdáveis em múltiplos locais do genoma de uma célula são responsáveis pela transformação progressiva de células normais em descendentes malignos. Mutações que levam ao ganho de função por parte de oncogenes e perda da função dos genes supressores de tumor (alterações genéticas e epigenéticas) são consideradas as bases do câncer. (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000; BLAGOSKLONNY, 2005).

Logo no início do processo de transformação, as células tornam-se imortais, podendo proliferar em condições desfavoráveis, desobedecendo aos limites normais do organismo e gerando um tumor/neoplasia benigno. Mais tardiamente no processo de progressão tumoral, elas adquirem a capacidade de invadir e colonizar outros órgãos (metástase), assim como sobreviver em locais diferentes do de origem, formando então tumores secundários, o que é conhecido como câncer. (BLAGOSKLONNY, 2003). Essas transformações normalmente incluem alterações fisiológicas como, por exemplo, autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais inibitórios do crescimento, evasão à morte celular programada, potencial ilimitado para replicação, promoção de angiogênese para sustentar seu crescimento, desregulação do metabolismo energético celular, escape da destruição pelo sistema imunológico, dentre outras. (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

O processo de metástase envolve uma série de eventos, desde o desprendimento das células cancerosas do tumor primário, sua penetração em vasos sanguíneos ou linfáticos até a invasão de outros locais do corpo, formando então tumores secundários. (BLAGOSKLONNY, 2003). O processo de invasão celular é um passo crítico para a metástase e é intimamente dependente da migração celular. Ou seja, a capacidade da célula sair do seu local original, se deslocar até outra região e de degradar a MEC por

enzimas proteolíticas como as metaloproteinases, permite que as células penetrem a barreira conferida normalmente pela MEC. (KAM et al., 2012). Células cancerosas comumente apresentam expressão alterada de moléculas de adesão célula-célula e célula-matriz, levando a mudanças no padrão de migração e favorecendo a invasão de tecidos adjacentes. (HANAHAH; WEINBERG, 2011).

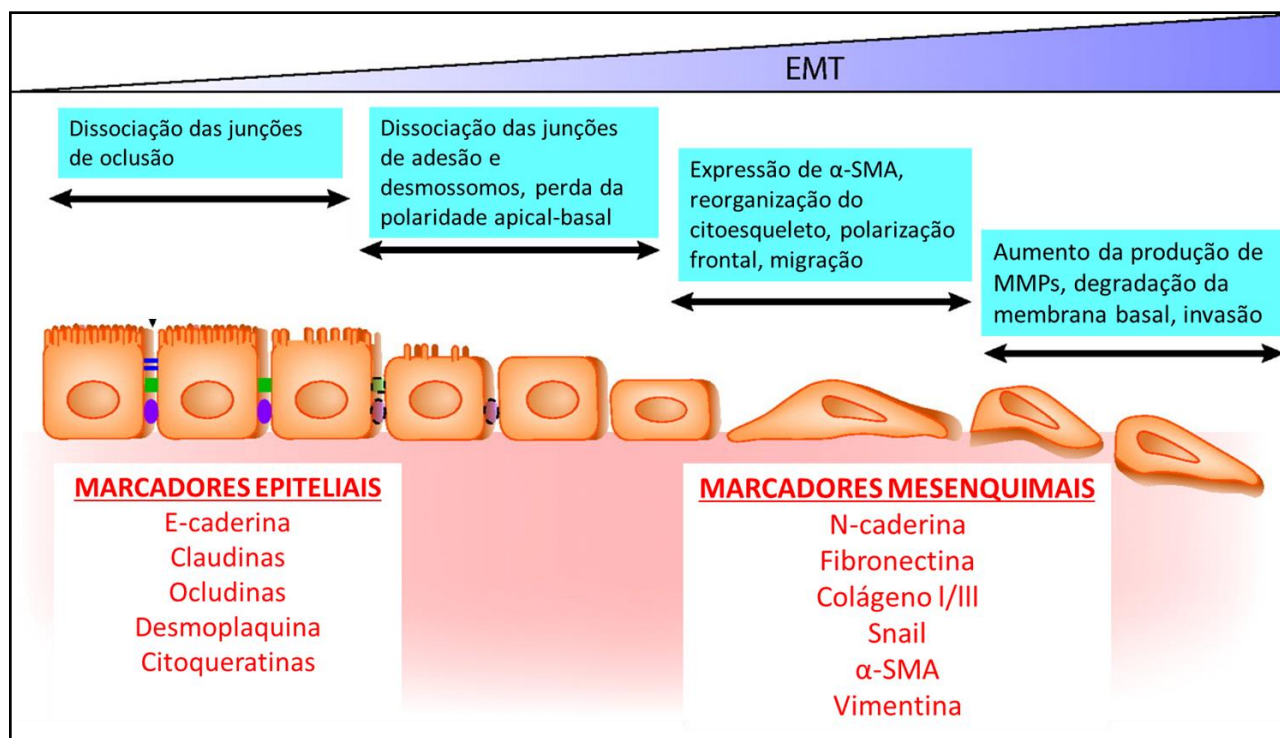
2.1.1. TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL

A transição epitelial-mesenquimal (EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*) é o nome dado ao processo de transição pelo qual passam células polarizadas originalmente residentes na camada basal da epiderme. Essas células sofrem diversas modificações bioquímicas que lhes permitem assumir um fenótipo mesenquimal, o qual inclui a perda da polarização e aquisição da capacidade de produzir enzimas que degradem a membrana basal onde a célula reside, permitindo-lhe migrar e escapar do epitélio. A célula passa a ser mais resistente à apoptose e adquire a capacidade de produzir moléculas da MEC. Esse processo de transição exige ativação de diversos fatores de transcrição, expressão de moléculas de adesão distintas daquelas presentes originalmente na célula, reorganização do citoesqueleto e produção de enzimas de degradação de matriz. (KALLURI; WEINBERG, 2009).

O processo de EMT é classificado em três subtipos: 1) relacionado à implantação, desenvolvimento do embrião e formação dos órgãos, formando diversos tipos celulares com características fenotípicas mesenquimais comuns; 2) relacionado à cicatrização, regeneração tecidual e fibrose, estando associado a processos inflamatórios; 3) ocorre em células neoplásicas que sofreram alterações genéticas e epigenéticas, fornecendo-lhes ferramentas para invasão e metástase. (KALLURI; WEINBERG, 2009).

Durante a EMT os complexos juncionais altamente especializados que mantêm as células unidas e, conseqüentemente, a integridade dos tecidos epiteliais são realocados na membrana das células ou direcionados para degradação, o que inclui alterações em proteínas como claudinas, ocludinas, caderinas e conexinas. Além disso, ocorre o rearranjo do citoesqueleto de actina, que deixa de ser posicionado corticalmente e passa a formar fibras, criando projeções de membrana chamadas invadopódios a fim de explorar o microambiente. Essas fibras são ainda capazes de gerar contração, o que permite que a célula gere a tração necessária para migrar (Figura 1). (LAMOUILLE et al., 2014).

FIGURA 1 - EVENTOS-CHAVE NA EMT



O esquema mostra as quatro etapas essenciais para a completa EMT e os marcadores epiteliais e mesenquimais mais comumente utilizados.

FONTE: adaptado de (AROEIRA et al., 2007). Copyright © 2007 by the American Society of Nephrology.

Aparentemente uma das características mais críticas para o processo de transição é a supressão da expressão de E-caderina, uma molécula de adesão célula-célula presente na maioria das células epiteliais normais que atua como supressor tumoral inibindo invasão e metástase. Células tumorais que apresentam ativação constitutiva da via PI3K/AKT (que será abordada posteriormente) acabam por reprimir a expressão gênica da E-caderina, levando ao aumento da motilidade e invasividade. Diversas outras vias de sinalização já foram responsabilizadas pela EMT, como Src, Ras, integrinas, Wnt/ β -catenin, Notch, etc, mas de uma forma ou de outra todas acabam convergindo para a ativação de AKT. (LARUE; BELLACOSA, 2005).

2.1.2. O MICROAMBIENTE TUMORAL

As células cancerosas malignas, apesar de suas características fenotípicas adquiridas por alterações genéticas e epigenéticas, não agem sozinhas no desenvolvimento da doença. Os tumores são estruturas complexas, compostas por múltiplos tipos celulares que participam em interações heterotípicas uns com os outros, formando o estroma associado ao tumor. Portanto, as células tumorais contam com

influência significativa das células do estroma, recrutando e corrompendo células normais para que contribuam para seu próprio crescimento. Elas podem ser divididas em três classes: células vasculares angiogênicas, células imunológicas infiltradas e células fibroblásticas associadas ao câncer (CAFs, do inglês *cancer-associated fibroblastic cells*). Essas últimas apresentam grande diversidade de contribuições funcionais, tendo influência sobre os processos fisiológicos caracteristicamente alterados em células tumorais citados anteriormente. (HANAHAH; COUSSENS, 2012). A comunicação intercelular é dirigida por redes complexas e dinâmicas de moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas inflamatórias e de remodelamento da matriz extracelular. (BALKWILL et al., 2012).

No presente trabalho daremos atenção especial à classe das CAFs, pois essas estão envolvidas em todos os processos que levam às transformações fisiológicas que permitem às células cancerosas tornarem-se malignas. Pertencem a essa classe os fibroblastos dos tecidos conectivos próximos ao local de crescimento do tumor e também miofibroblastos e adipócitos diferenciados a partir de células tronco por sinais emitidos pelas células tumorais. Os CAFs podem ser originados a partir de precursores residentes, como células endoteliais, células musculares lisas e mioepiteliais ou células-tronco mesenquimais. Os fibroblastos são encontrados em diferentes proporções através do espectro de carcinomas, constituindo em muitos casos o tipo celular predominante no estroma do tumor. (HANAHAH; WEINBERG, 2011; BALKWILL et al., 2012).

Apesar de o conceito de “semente e solo” (do inglês *“seed and soil”*) ter sido proposto há mais de cem anos por Stephen Paget, sugerindo que a preferência das células cancerosas por efetuar metástase em órgãos específicos se dá pela interação dessas células (“sementes”) com o microambiente do órgão alvo (“solo”), apenas recentemente os cientistas tem compreendido melhor a real importância do estroma tumoral para o desenvolvimento da doença. Os fibroblastos são células reconhecidamente fundamentais à homeostase tecidual, bem como ao processo de cicatrização, e surgem cada vez mais evidências de que são também determinantes nos processos de progressão tumoral, o que vai ao encontro da hipótese de que “o tumor é uma ferida que nunca cura”. (ÖHLUND et al., 2014). Portanto, são diversas as evidências da participação dos CAFs nas diferentes etapas do processo de transformação tumoral.

Os CAFs são capazes de expressar e secretar proteínas sinalizadoras, metaloproteinases, glicosaminoglicanos, e citocinas, dentre as quais se encontram diversos fatores de crescimento, oferecendo suporte às modificações da MEC e estimulando a proliferação das células cancerosas. (WILLENBERG et al., 2012). Em

alguns tipos de tumor, incluindo os de pele, os CAFs expressam assinatura gênica pró-inflamatória, o que contribui para suportar o crescimento do tumor pelo aumento da neovascularização e recrutamento de células inflamatórias. (BALKWILL et al., 2012).

Os CAFs podem influenciar na resistência à morte celular apresentada por células cancerosas, devido à secreção de fatores de sobrevivência, como IGF-1 e 2. (SATYAMOORTHY et al., 2001), e/ou à formação de uma MEC neoplástica (diferente da matriz original do estroma) através da síntese de novas moléculas da matriz e de proteases responsáveis pela remodelação da mesma, fornecendo sinais de sobrevivência às células neoplásticas. (FLACH et al., 2011).

2.1.3. MELANOMA

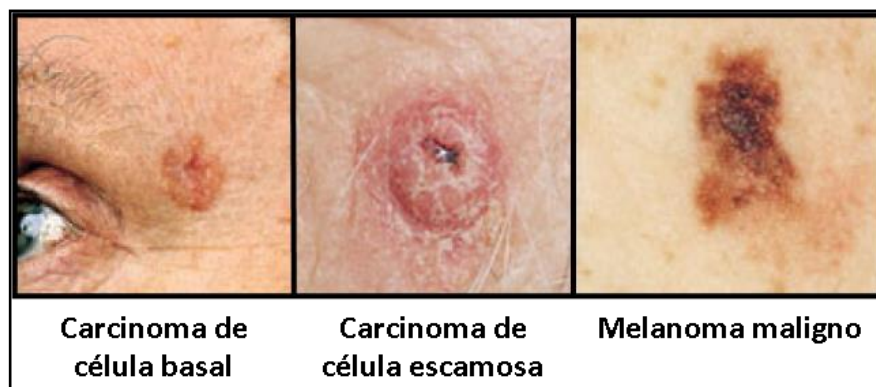
A maioria dos cânceres contém características que refletem sua origem. Histologicamente, os tipos de câncer são agrupados nas seguintes categorias: carcinomas (derivados de células epiteliais), sarcomas (derivados do tecido conectivo ou células musculares), mielomas (derivados de células plasmáticas da medula óssea), leucemias (derivadas de leucócitos) e linfomas (derivados de glândulas ou nodos do sistema linfático). (NIH).

Os cânceres de pele podem ser do tipo não melanoma ou melanoma maligno (apesar de parecer redundante, uma vez que só se considera melanoma quando já se estabeleceu um quadro de malignidade, melanoma maligno é o termo mais comumente encontrado na literatura). Os do primeiro tipo compreendem os carcinomas de células basais e escamosas, sendo raramente letais, com possibilidade de tratamento cirúrgico, porém doloroso e frequentemente desfigurante. São frequentes em partes do corpo comumente expostas ao sol, como orelhas, face, pescoço e antebraços (Figura 2). Já o melanoma, apesar de menos frequente do que os cânceres de pele do tipo não melanoma, é a maior causa de morte por câncer de pele. O risco de desenvolvimento de melanoma está relacionado com características genéticas e pessoais, como o comportamento de exposição a raios ultravioleta. (WHO, 2014b).

Apesar de a grande maioria dos melanomas serem claramente causados pela exposição solar, eventualmente podem ocorrer tumores em pessoas de pele negra – que por possuírem grandes quantidades de melanina na pele estariam teoricamente mais protegidas de mutações causadas por radiação UV - ou em locais do corpo não expostos ao sol, como solas dos pés, embaixo das unhas e em cavidades mucosas (boca e vagina,

por exemplo), o que sugere uma biologia diferente para estes tipos de melanoma. (GUPTA, 2014).

FIGURA 2 – DIFERENTES TIPOS DE CÂNCER DE PELE



FONTE: adaptado de (WHO, 2014b).

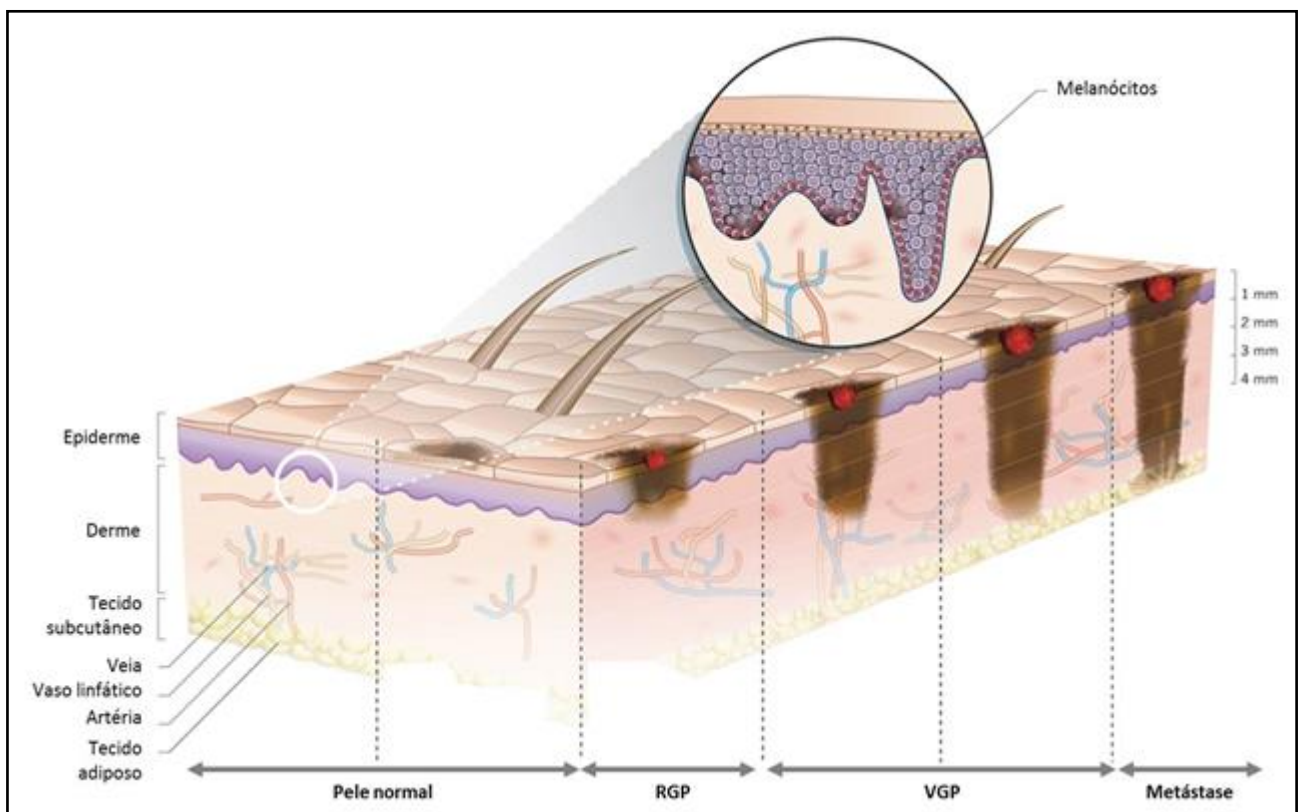
O melanoma é o 19º tipo de câncer mais frequente no mundo, com aproximadamente 232 mil novos casos diagnosticados em 2012, contabilizando 2% de todos os cânceres. (HOLMES, 2014). A maioria dos estudos epidemiológicos mostra aumento da incidência de melanoma dentre populações caucasianas ao longo das últimas décadas, com previsão de crescimento no número de casos. No Brasil, a previsão para o ano de 2016 é de que surjam cerca de 5670 novos casos de melanoma, totalizando aproximadamente 5,62 casos para cada 100 mil habitantes. (INCA, 2015). Felizmente, esse aumento na incidência não vem acompanhado do aumento na mortalidade devido ao melanoma, a qual tem se mostrado estável desde a década de 80, refletindo os efeitos do diagnóstico precoce em estágios favoráveis à cura. (NIKOLAOU; STRATIGOS, 2014).

O melanoma tem origem nos melanócitos, que são células especializadas encontradas predominantemente na pele e olhos, onde, dentre outras funções, produzem o pigmento responsável pela coloração, a melanina. (HOLMES, 2014). Porém, melanócitos também podem ser encontrados na orelha interna, no sistema nervoso, coração, dentre outros locais do corpo. Essas células são originadas a partir da diferenciação de células da crista neural durante o desenvolvimento embrionário. Na pele, os melanócitos residem na camada basal da epiderme e nos folículos pilosos, formando as unidades produtoras de melanina da epiderme, sendo que sua homeostase é regulada pelos queratinócitos, com os quais estabelecem inúmeros contatos através de projeções de membrana. Melanócitos possuem papel fundamental na proteção da pele contra os danos causados pelos raios UV e também na prevenção contra o câncer de pele. Parece contraditório que os melanócitos sejam os precursores do melanoma, porém, mutações em genes regulatórios do crescimento, produção autócrina de fatores de crescimento e a

perda de moléculas de adesão contribuem para a perturbação da sinalização intracelular nessas células, permitindo que elas escapem do controle rigoroso dos queratinócitos. (GRAY-SCHOPFER et al., 2007). Consequentemente, os melanócitos podem proliferar e espalhar-se, levando à formação de nevos.

A proliferação exacerbada pode ficar restrita à epiderme ou à derme, constituindo geralmente tumores benignos. Porém, podem progredir para a fase de crescimento radial (RGP, do inglês *radial growth phase*), formando uma lesão na epiderme, que pode envolver micro invasão na derme. Essas células podem passar a crescer verticalmente (VGP, do inglês *vertical growth phase*), atingindo um estágio mais perigoso, com nódulos invadindo a derme, onde as células apresentam potencial metastático (Figura 3). Apesar de ser um desenvolvimento gradual, nem todos os melanomas passam por todas as fases descritas. (ZAIDI et al., 2008).

FIGURA 3 – FASES DE PROGRESSÃO DO MELANOMA



A proliferação anormal dos melanócitos leva à formação de nevos benignos. Melanomas em RGP são capazes de crescer intraepidemicamente, seguido pela invasão da derme na VGP e culminando em metástase.

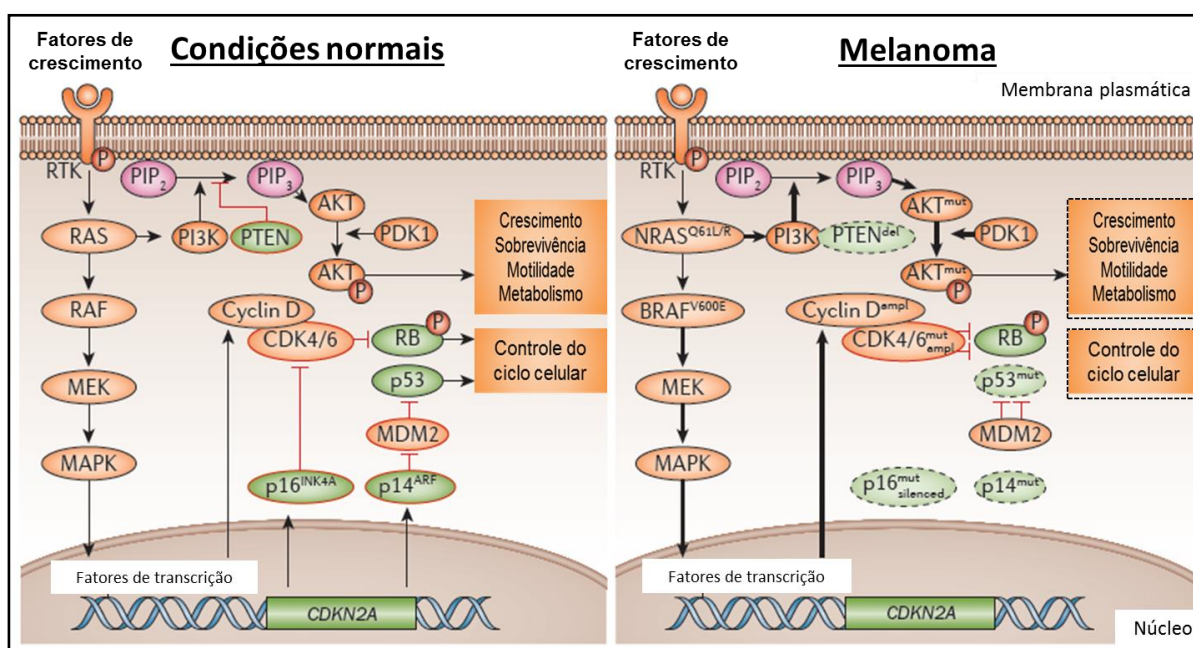
FONTE: adaptado de (HOLMES, 2014). © 2014 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

2.1.3.1. VIAS DE SINALIZAÇÃO EM MELANOMA

Durante a progressão tumoral ocorre a perda irreversível do controle da transdução de sinal, levando à hiperativação e/ou silenciamento de vias específicas, permitindo que as células adquiram características como resistência à apoptose, proliferação anormal, além de capacidades de promover angiogênese e invasão, favorecendo o processo de progressão. (YAJIMA et al., 2012).

Células tumorais comumente apresentam mutações somáticas responsáveis pela ativação constitutiva de vias de sinalização que normalmente seriam ativadas pela interação de fatores de crescimento com seus receptores. As vias da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) – que inclui as quinases reguladas por sinal extracelular (ERKs) e *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) - e da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) são exemplos de vias de sinalização ativadas constitutivamente em células tumorais (Figura 4). (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

FIGURA 4 – VIAS DE SINALIZAÇÃO EM MELANOMA



Em condições normais as vias da MAPK e PI3K dependem da ligação de fatores de crescimento a receptores de superfície para serem ativadas. Essas vias são responsáveis pela manutenção do equilíbrio dos processos de proliferação celular, morte, motilidade e outros aspectos metabólicos. No entanto, células de melanoma apresentam essas duas vias constitutivamente ativadas, seja devido a mutações genéticas ou à autossuficiência na produção de fatores de crescimento que, por sua vez, mantém as vias ativadas, levando ao descontrole dos processos celulares regulados por elas.

FONTE: adaptado de (SCHADENDORF et al., 2015). © 2015 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

Além das mutações, a hiperatividade de algumas vias pode se dar pela habilidade adquirida pelos melanócitos durante o processo de transformação maligna de secretar fatores de crescimento de forma autócrina, como por exemplo, bFGF (do inglês *basic fibroblast growth factor*), HGF (do inglês *hepatocyte growth factor*), IGF-1 (do inglês *insulin-*

like growth fator 1), α -MSH (do inglês *alpha-melanocyte-stimulating hormone*) e EGF (do inglês *epidermal growth fator*), cuja ação conjunta ativa e sustenta essas vias nas células. (SMALLEY, 2003; GRAY-SCHOPFER et al., 2007).

2.1.3.2. TRATAMENTOS VIGENTES PARA MELANOMA

O tratamento do câncer requer geralmente a escolha cautelosa de uma ou mais intervenções, como cirurgia, radioterapia ou quimioterapia, com o objetivo de curar a doença ou prolongar consideravelmente o tempo de vida do paciente, enquanto busca melhora na qualidade de vida. (WHO, 2014). As terapias atuais para a maior parte dos tipos de câncer são transitórias e insatisfatoriamente eficazes. (HANAHAN; COUSSENS, 2012).

Se o melanoma for diagnosticado precocemente, pode ser curado pela remoção cirúrgica, e cerca de 80% dos casos são tratados dessa forma. No entanto, esse procedimento pode deixar para trás células malignas circulantes, que muitas vezes podem dar origem a novos tumores. (MAVERAKIS et al., 2015). Ao contrário, o melanoma metastático é altamente refratário às terapias existentes. (GRAY-SCHOPFER et al., 2007). Pacientes com melanoma avançado, portando com metástase, apresentam prognóstico desfavorável. No entanto, devido principalmente ao diagnóstico precoce desses casos, o tempo de sobrevida desses pacientes tem aumentado. Apesar do aumento da resposta alcançado pela combinação de quimioterápicos (por exemplo, dacarbazina e temozolomida) ou desses somados a citocinas (como interferon e IL-2), nos últimos quarenta anos nenhum impacto realmente significativo no tempo de sobrevida foi alcançado. Felizmente, recentemente têm-se realizado estudos e descobertas interessantes com relação a drogas direcionadas para matar as células de melanoma e/ou modular o sistema imunológico do paciente, como por exemplo, inibidores de vias de transdução de sinal cujos membros foram identificados como mutados em pacientes com melanoma e também anticorpos capazes de modular a ação do sistema imunológico em prol da destruição das células cancerosas. (EGGERMONT; ROBERT, 2011). Recentemente, por exemplo, foram encontrados efeitos promissores para o tratamento de pacientes refratários a outras terapias para melanoma com anticorpos contra PD-1, um receptor de morte celular programada que inibe a atividade citotóxica de linfócitos T e para o qual células de melanoma apresentam ligantes. O bloqueio do receptor usando anticorpos apresentou resultados positivos, foi seguro e bem tolerado pelos pacientes. No

entanto, foram observados efeitos indesejáveis, como fadiga, prurido e erupções cutâneas. (ROBERT et al., 2014).

A ciência tem avançado no estudo e descoberta de drogas mais eficientes para o tratamento do melanoma e que sejam menos desgastantes para os pacientes. Por exemplo, o tratamento com dabrafenibe mostrou-se mais eficiente ao promover regressão da doença, com maior taxa de sobrevivência sem progressão, bem como apresentou vantagem aos pacientes no que diz respeito à qualidade de vida durante o tratamento quando comparado ao tratamento convencional com dacarbazina. (GROB et al., 2014).

Nos últimos anos têm-se tentado inclusive desenvolver vacinas contra vários tipos de câncer, incluindo o melanoma. Essas vacinas podem conter antígenos ou até mesmo células inteiras e têm como objetivo estimular o sistema imunológico do paciente a reconhecer e destruir células cancerosas. Esses estudos têm demonstrado efeitos interessantes no melanoma, porém ainda precisam ser melhorados para que apresentem resultados realmente efetivos. (MAVERAKIS et al., 2015).

Entretanto, apesar dos avanços adquiridos, a ciência e a medicina ainda se encontram longe de encontrar a cura para o melanoma.

2.1.3.3. ALTAS DILUIÇÕES E CÂNCER

Resultados obtidos na clínica e em estudos de laboratório apresentam diversas evidências dos efeitos benéficos resultantes do uso de altas diluições no tratamento de câncer. Foi mostrado que pacientes com câncer apresentam melhoria na qualidade de vida, redução do sofrimento devido aos sintomas e até mesmo aumento na expectativa de vida. Em modelos animais vários tratamentos com altas diluições mostram redução do desenvolvimento tumoral e, com o avanço das pesquisas científicas, têm-se observado até mesmo alterações diretamente nas células tumorais. (BHATTACHARYA; ZHANG, 2015; FRENKEL, 2015).

Em modelos laboratoriais, foram demonstrados efeitos de alguns dos compostos bastante utilizados na clínica. O tratamento *in vitro* de células da linhagem de câncer cervical HeLa com *Gonolobus condurango* 30CH foi capaz de induzir citotoxicidade nessas células, causando modificações epigenéticas, levando à redução da síntese de DNA e parada do ciclo celular na fase G1. (BISHAYEE et al., 2013). Outras soluções altamente diluídas apresentam efeitos semelhantes *in vitro*. Por exemplo, *Carsinosin*, *Phytolacca*, *Conium* e *Thuja* exercem efeito citotóxico preferencialmente sobre células de

linhagens de câncer de mama quando comparadas a células epiteliais mamárias normais, levando as primeiras à parada do ciclo celular e apoptose como resultado de alterações na expressão de proteínas regulatórias do ciclo celular. (FRENKEL et al., 2010). Já os tratamentos com *Sarsaparilla*, *Ruta graveolens* e *Phytolacca decandra* apresentam efeito citotóxico e de redução da proliferação em linhagens celulares de adenocarcinoma renal, carcinoma colorretal e de mama, respectivamente. (ARORA et al., 2013). Da mesma forma, o tratamento *in vitro* com *Sabal serrulata* resultou na redução da capacidade proliferativa de células de linhagem de câncer de próstata, o que foi acompanhado pela redução do crescimento de tumores de próstata *in vivo*. (MACLAUGHLIN et al., 2006). *Hydrastis canadensis* oferecido oralmente inibiu significativamente o crescimento de tumores sólidos já desenvolvidos produzidos a partir de células de ascite linfoma de Dalton, aumentando o tempo de vida dos animais. O mesmo trabalho mostrou ainda atividade anti-metastática em modelo de melanoma murino, onde os tratamentos com *Thuja*, *Hydrastis* e *Lycopodium* reduziram a formação de nódulos pulmonares gerados a partir de células de melanoma da linhagem B16-F10. (SUNILA et al., 2007). Esses são apenas alguns dos trabalhos encontrados na literatura que descrevem efeitos importantes do tratamento com altas diluições em modelos de câncer.

Apesar das evidências científicas da eficácia dessas soluções no tratamento do câncer (bem como para outras doenças), frequentemente nos deparamos com situações nas quais predomina o preconceito contra esse tipo de terapia, onde geralmente se alega a ausência de moléculas nas soluções altamente diluídas. Entretanto, nos últimos anos tem-se investigado com mais atenção a possível presença de moléculas derivadas da solução de partida em soluções altamente diluídas. Verificou-se que ao longo das diluições seriadas as moléculas da matéria original podem ficar em suspensão na interface ar-líquido das soluções, sendo assim passadas adiante nas diluições seguintes e mantendo a presença dessas moléculas mesmo após várias diluições na forma de nanopartículas. (CHIKRAMANE et al., 2012). As agitações vigorosas usadas no processo de potenciação podem fazer com que a informação do material de partida fique contida em nanoestruturas ricas em silicone ou sílica, derivados dos recipientes onde são preparadas as soluções. Dessa forma, as altas diluições poderiam ser vistas como um sistema de nanomedicina, uma vez que essas nanoestruturas podem ser reconhecidas pelas células, desencadeando assim os efeitos observados após esse tipo de tratamento. (UPADHYAY; NAYAK, 2011).

Felizmente, nas últimas décadas até mesmo a aplicação clínica da homeopatia vem se adequando aos avanços científicos. Em 2013 foi lançado um livro chamado *THE*

BANERJI PROTOCOLS - A New Method of Treatment with Homeopathic Medicines. Esse protocolo foi elaborado levando em conta o diagnóstico médico da doença bem como os sintomas que afligem os pacientes. De acordo com esse método desenvolvido na Índia, cada paciente recebe medicamentos específicos para a doença com a qual foi diagnosticado com base em métodos diagnósticos modernos, o que não acontece no tratamento com homeopatia clássica. Atualmente, pacientes de mais de 70 países, muitos deles com câncer, se beneficiam dessa nova metodologia de tratamento utilizando altas diluições de compostos naturais. (PBHRF, 2014). Segundo revisão feita por Bell e colaboradores em 2014, muitas fontes de medicamentos utilizados pelos Protocolos Banerji se sobrepõem àquelas já sendo estudadas em pesquisas de nanopartículas e nanovesículas para desenvolvimento de vacinas contra o câncer. Por exemplo, pesquisas acerca dos efeitos antineoplásicos de nanoformas de extratos botânicos (tais como *Phytolacca*, *Gelsemium*, *Hydrastis*, *Thuja* e *Ruta*) são também realizadas com formulações homeopáticas feitas a partir dessas mesmas fontes. Esse trabalho sugere que deva haver um somatório dos efeitos específicos gerados pelos extratos naturais sobre a doença aliados aos efeitos não específicos gerados pelas nanoestruturas de sílica e silicone sobre a ativação do sistema imunológico e amplificação da resposta imunológica. (BELL et al., 2014).

Essa nova visão frente à presença de moléculas na forma de nanoestruturas em soluções altamente diluídas desmistifica em parte o preconceito existente contra esse tipo de terapia e abre possibilidades frente à comunidade científica para que se possa estudar seus efeitos e mecanismos de ação em sistemas biológicos, fornecendo maior segurança e efetividade para o uso em pacientes portadores dos mais diversos tipos de enfermidades, inclusive de câncer.

Prova dessa nova postura é a institucionalização da homeopatia no Sistema Único de Saúde brasileiro (SUS) como parte da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015), o que pode vir a aumentar a procura por esse tipo de terapia.

3. JUSTIFICATIVA

A busca do reestabelecimento do bem-estar físico, mental e social do paciente, bem como a eliminação da doença são as metas de vários hospitais reconhecidos, como o Hospital Israelita Albert Einstein, por exemplo. Com esse princípio, a medicina integrativa tem como principal foco de atenção o paciente como um todo (corpo, mente e espírito) e não a doença em si. (HOSPITAL ALBERT EINSTEIN, 2011). A utilização da homeopatia, considerada como especialidade médica pelo Conselho Federal de Medicina desde 1980, como medicina integrativa tem acrescentado aos pacientes esperança de melhora quando nenhum outro tratamento é eficaz. Porém, contrariamente ao que acontece com medicamentos alopáticos, a homeopatia vem sendo comercializada e utilizada clinicamente há mais de duzentos anos sem que haja estudos científicos prévios a respeito da eficácia, segurança e modo de ação desses produtos. O fato de se tratar de compostos altamente diluídos não garante que sejam seguros, que não apresentem efeitos colaterais e principalmente que sejam eficazes. A reduzida quantidade de estudos acadêmico-científicos quando comparada à de compostos alopáticos, o efeito placebo e as altas diluições embasam parte do preconceito existente contra a homeopatia. Dessa forma, destaca-se a importância de se estudar, de forma séria e controlada, os efeitos dos compostos e complexos naturais altamente diluídos. Portanto, a utilização de métodos científicos rigorosos em diferentes modelos biológicos, como animais e cultura de células por exemplo, deve ser realizada a fim de se obter bases para a consolidação da homeopatia no âmbito científico.

O Laboratório de Células Inflamatórias e Neoplásicas vem realizando pesquisas há quase vinte anos com o intuito de entender de que forma os compostos e CNADs atuam em modelos biológicos a nível sistêmico, celular e molecular. Essas pesquisas não apresentam vínculos de interesse e são realizadas de forma multicêntrica em parceria com laboratórios nacionais e internacionais, a fim de fornecer embasamento teórico e maior segurança na hora de prescrever esses medicamentos aos pacientes. Em pesquisa com células de melanoma, após tratamento com M1 ou M8, observou-se *in vivo* redução de metástase pulmonar, com menor quantidade e tamanho de nódulos (GUIMARÃES et al., 2010), redução de angiogênese e aumento da porcentagem de áreas de morte celular, favorecendo a redução de crescimento de tumor sólido. (FERRARI DE ANDRADE et al., 2016). *In vitro* foi observada diminuição de características importantes no processo de metástase (GUIMARÃES et al., 2010), assim como alteração no fenótipo de malignidade

nessas células (POTRICH, 2014). Esse último trabalho mostrou várias alterações que podem estar relacionadas com vias de sinalização atuantes em células tumorais, fornecendo indícios dos mecanismos que podem culminar nos efeitos antitumorais do M1 e M8.

Hoje se sabe que os tumores são formados por muito mais do que apenas uma massa relativamente homogênea de células cancerosas que se proliferam indefinidamente, sendo então reconhecidos por sua complexidade excedendo até mesmo à de tecidos saudáveis. Portanto, a biologia dos tumores só pode ser compreendida através do estudo de cada tipo celular individualizado, assim como do microambiente tumoral construído ao longo do processo de tumorigênese. (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Dessa forma, esse trabalho tem como objetivo entender de que forma os complexos M1 ou M8 atuam diretamente sobre os mecanismos moleculares de células de melanoma murino *in vitro*, resultando na redução de suas características metastáticas observadas *in vivo*, bem como avaliar se induzem algum tipo de alteração no processo de comunicação entre essas células cancerosas e fibroblastos, uma vez que esses últimos possuem papel fundamental na progressão tumoral.

4. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo identificar e avaliar *in vitro* possíveis mecanismos celulares e moleculares envolvidos na atividade antimelanoma dos CNADs M1 ou M8 diretamente em células de linhagem de melanoma murino ou em ambiente tumoral artificial (cocultura). Portanto, o trabalho foi dividido em duas partes, como descrito a seguir.

PARTE I: Potrich (2014) mostrou que o tratamento *in vitro*, tanto com M1 quanto com M8, é capaz de reduzir a capacidade migratória de células de melanoma, bem como alterar a expressão gênica de moléculas importantes para esse processo, como glicosaminoglicanos, proteoglicanos e MMPs. Esses fatores alterados pelos tratamentos são geralmente regulados pela via de sinalização da PI3K. (SLOMINSKI et al., 2004; PRICE et al., 2011). Portanto, o objetivo dessa parte do trabalho foi verificar os efeitos do tratamento *in vitro* com M1 ou M8 sobre a expressão/atividade de outras moléculas e proteínas relacionadas a vias de sinalização envolvidas em fenótipos metastáticos e sobre a capacidade tumorigênica de células de melanoma murino B16-F10.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar em B16-F10, tratadas *in vitro* com M1 ou M8:

- moléculas de superfície envolvidas no processo de progressão do melanoma (CD44, N-caderina, PGCS4/NG2, CD54/ICAM-1 e LAMP-1);
- proteínas envolvidas em vias de sinalização intracelulares importantes para a progressão do melanoma (AKT e β -catenina);
- a atividade gelatinolítica da metaloproteinase secretada MMP-2;
- a capacidade celular de formar colônias em gel de alginato.

PARTE II: Os tratamentos com M1 ou M8 modificaram a capacidade de migração e invasão de células de melanoma tanto *in vitro* quanto *in vivo*. (GUIMARÃES et al., 2009; POTRICH, 2014). Além disso, reduziram a produção de AH também *in vivo* e *in vitro* (ANDRADE, 2011; POTRICH, 2014), uma das moléculas responsáveis por essas e outras características tumorais (motilidade, estimulação do crescimento, resistência multidrogas) (SIRONEN et al., 2011) e que é estimulado a ser produzido por fibroblastos na presença de células de melanoma (WILLENBERG et al., 2012). Dessa forma, o objetivo dessa parte

do trabalho foi verificar os efeitos do tratamento *in vitro* com M1 ou M8 sobre as moléculas envolvidas em processos de comunicação entre B16-F10 e fibroblastos murinos Balb/3T3.

Anteriormente à verificação dos efeitos dos tratamentos com M1 ou M8 sobre a comunicação entre B16-F10 e fibroblastos foi avaliado se esses tratamentos alteram o comportamento dos fibroblastos isolados, uma vez que nós conhecemos seus efeitos sobre B16-F10 isoladas – vide trabalhos do nosso grupo de pesquisa citados anteriormente - mas não sobre os fibroblastos. Para tal, foram analisadas a viabilidade e proliferação de fibroblastos murinos Balb/3T3 tratados *in vitro* com M1 ou M8.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar em cocultura entre Balb/3T3 e B16-F10, tratada com M1 ou M8:

- o marcador de CAFs (α -SMA);
- a produção/secreção de ácido hialurônico;
- moléculas mediadoras da comunicação intercelular (CD44 e N-caderina);
- a atividade gelatinolítica da metaloproteinase secretada MMP-2.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no âmbito do Laboratório de Células Inflamatórias e Neoplásicas e do Laboratório de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados, situados no Departamento de Biologia Celular, no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

Os protocolos detalhados de cada metodologia encontram-se em anexo, portanto, a seguir serão descritos brevemente.

5.1. PREPARAÇÃO DOS CNADs - M1 E M8

Os complexos utilizados nesse trabalho foram manipulados e cedidos gentilmente pela Farmácia de Manipulação Homeoterápica de Curitiba (<http://www.homeoterapica.com.br/>). Foram utilizados dois complexos naturais altamente diluídos denominados M1 ou M8, cujas composições estão descritas na Tabela 1 e abrangem quatro das cinco substâncias mais utilizadas em pesquisa básica com altas diluições (*Arsenicum album*, *Sulphur*, *Thuja* e *Phosphorus*), segundo revisão feita a partir dos dados da HomBRex (do inglês '*Homeopathy Basic Research experiments*' database). (CLAUSEN et al., 2011). Água destilada utilizada como veículo para diluição dos complexos foi utilizada como controle dos tratamentos. Para a realização dos ensaios, os complexos foram esterilizados por filtração em membranas estéreis 0,22µm (Millipore) e mantidos protegidos da luz à temperatura ambiente.

5.2. CULTIVO CELULAR

Foram utilizadas células de linhagem de melanoma murino B16-F10 (BCRJ, 0046), e de fibroblastos murinos Balb/3T3 (ATCC, CCL-163). Essas células foram mantidas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (livre de endotoxinas) (Sigma ou GIBCO) contendo 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 0,11 g/L de piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino (SFB) (LifeTechnologies) não inativado, 1 U/mL de penicilina e 1 µg/mL de streptomicina (LifeTechnologies) a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DOS COMPLEXOS NATURAIS ALTAMENTE DILUÍDOS.

ORIGEM DOS COMPONENTES	COMPONENTES	MATRIZ	CONCENTRAÇÃO FINAL		CONCENTRAÇÃO FINAL V/V (%)
			M1	M8	
Vegetal	<i>Aconitum napellus</i>	TM*	20 dH	20 dH	0.1×10^{-19}
Mineral	<i>Arsenicum album</i>	6 dH	18 dH	18 dH	0.1×10^{-17}
Vegetal	<i>Asa foetida</i>	TM*	20 dH	20 dH	0.1×10^{-19}
Animal	<i>Calcarea carbonica</i>	8 dH	16 dH	16 dH	0.1×10^{-15}
Vegetal	<i>Chelidonium majus</i>	TM*	20 dH	-	0.1×10^{-19}
Vegetal	<i>Cinnamon</i>	TM*	20 dH	-	0.1×10^{-19}
Vegetal	<i>Conium maculatum</i>	5 dH	17 dH	17 dH	0.1×10^{-16}
Vegetal	<i>Echinacea purpurea</i>	TM*	20 dH	-	0.1×10^{-19}
Vegetal	<i>Gelsemium sempervirens</i>	TM*	20 dH	-	0.1×10^{-19}
Vegetal	<i>Ipecacuanha</i>	5 dH	13 dH	13 dH	0.1×10^{-12}
Mineral	<i>Phosphorus</i>	12 dH	20 dH	20 dH	0.1×10^{-19}
Vegetal	<i>Rhus toxicodendron</i>	6 dH	17 dH	17 dH	0.1×10^{-16}
Mineral	<i>Silicea</i>	12 dH	20 dH	20 dH	0.1×10^{-19}
Mineral	<i>Sulphur</i>	12 dH	24 dH	24 dH	0.1×10^{-23}
Vegetal	<i>Thuja occidentalis</i>	6 dH	19 dH	19 dH	0.1×10^{-18}

FONTE: (Adaptado de DE OLIVEIRA et al., 2011).

NOTA: *TM = tintura mãe

O subcultivo de ambos os tipos celulares foi feito sempre ao atingir confluência máxima de 80% da área de crescimento, de acordo com o protocolo padrão de cultivo estabelecido pelo nosso grupo para essas linhagens. Para tal, as células foram lavadas com PBS a 37°C e incubadas com 0,05% de tripsina-EDTA (GIBCO) em PBS por 3 minutos a 37°C, seguida de inativação com meio DMEM contendo 10% de SFB.

Para os experimentos de cada tipo celular individualizado as células B16-F10 foram plaqueadas na densidade de $1,2 \times 10^3$ células/cm², enquanto as Balb/3T3 na densidade de 3×10^3 células/cm², determinadas após observação da manutenção das capacidades proliferativas e características intrínsecas de cada célula. Já no caso da cocultura, ambos os tipos celulares foram plaqueados na densidade de $1,2 \times 10^3$ células/cm² para cada tipo para que se obtivesse a proporção de 1 B16-F10 : 1 Balb/3T3, somando $2,4 \times 10^3$ células totais/cm². As células foram mantidas e utilizadas até a quinta passagem para B16-F10 e décima passagem para Balb/3T3.

5.3. TRATAMENTO IN VITRO

Passadas 6-8 horas do plaqueamento celular em frascos de cultura apropriados, as células foram tratadas com os complexos (M1 ou M8) ou veículo. A concentração de 20%

(v/v) foi utilizada, sendo que foi administrado reforço de 1% (v/v) a cada 24 horas, até completar 96 horas de tratamento. Os complexos e o veículo foram vigorosamente agitados (sucussionados) 20 vezes contra a palma da mão, imediatamente antes de cada tratamento. Todos os experimentos incluíram um grupo sem tratamento para fins de controle interno de funcionamento do ensaio.

5.4. IMUNOMARCAÇÕES PARA CITOMETRIA DE FLUXO E TRIAGEM DE ALTO RENDIMENTO

As células cultivadas e tratadas em garrafas de cultura de 25 cm² ou placas de 6 poços foram desaderidas mecanicamente com *cell scraper* (rodinho) e passadas para tubos de citômetro identificados, no caso do processamento para citometria de fluxo. Já as células destinadas à análise por triagem de alto rendimento (high-content imaging) foram cultivadas e tratadas em placas de 96 poços com paredes pretas e fundo transparente e seu processamento foi feito sobre as células aderidas na própria placa. Essa segunda metodologia permite a obtenção de imagens da marcação celular com os anticorpos, bem como sua quantificação, em larga escala, uma vez que o ensaio é realizado em placas de 96 poços. A fixação das células foi feita em paraformaldeído 2% (EMS) em PBS, o bloqueio de radicais aldeídos com 0,1 M de glicina (VETEC) em PBS, pH 7,4, permeabilização com saponina 0,01% (SigmaAldrich) em PBS, bloqueio de sítios inespecíficos com BSA 1% (SigmaAldrich) em PBS. As marcações externas foram feitas com as células ainda vivas, enquanto as internas foram feitas após a fixação.

Os anticorpos primários utilizados foram:

- IgG anti-N-caderina (Santa Cruz, sc-31030) – Anexos 2 e 7,
- IgG2b anti-CD44 (BD, 550538) – Anexo 1,
- IgG anti- LAMP-1 (sc-8098) – Anexo 3,
- Anti-mouse CD54 conjugado com PE (BD, 553253) – Anexo 4,
- IgG anti-NG2 (Santa Cruz, sc-30921) – Anexo 5,

Os anticorpos secundários utilizados foram:

- Anti-goat IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A11078),
- Anti-rat IgG conjugado com FITC (Jackson, 112-095-003),

As amostras foram lidas em citômetro de fluxo BD FACSCalibur, utilizando o software CellQuest (BD Biosciences) e os lasers e canais de detecção apropriados para cada fluoróforo ou no equipamento de triagem de alto rendimento ImageXpress Micro® *High-Content Imaging* (Molecular Devices), utilizando também filtros de excitação e

emissão adequados para cada fluoróforo. No citômetro foram adquiridos 10000 eventos de cada amostra e os dados foram analisados utilizando o programa Flowing Software 2. Já no equipamento de triagem os poços da placa foram escaneados (quatro regiões de cada poço, abrangendo praticamente toda a área dos mesmos), obtendo-se imagens das imunomarcações, as quais foram gentilmente analisadas pela Luciane Ganiko, da empresa Molecular Devices.

5.5. *IMUNOMARCAÇÕES PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA CONFOCAL*

As células cultivadas sobre lamínulas e tratadas em placas de 24 poços foram processadas seguindo a mesma metodologia descrita para citometria de fluxo, com a diferença de que permaneceram aderidas às lamínulas e os processos de incubações e lavagens foram feitos na própria placa.

Os anticorpos primários utilizados foram:

- IgG anti-N-caderina (Santa Cruz, sc-31030) – Anexo 7,
- IgG anti- β -catenina (Millipore, 06-734) – Anexo 6.

Os anticorpos secundários utilizados foram:

- Anti-goat IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A11078),
- Anti-rabbit IgG conjugado com Alexa Fluor 647 (Invitrogen, A31573).

As lâminas foram montadas com meio de montagem Prolong Gold com DAPI (Molecular Probes) e observadas em microscópio de varredura a laser confocal A1R MP (NIKON), utilizando os comprimentos de onda apropriados para cada fluoróforo. Foram obtidas imagens representativas de cada amostra utilizando objetiva de 60 vezes. A montagem dos planos focais e processamento das imagens foram feitos utilizando o programa Fiji. (SCHINDELIN et al., 2012).

5.6. *EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS CELULARES TOTAIS*

As células cultivadas e tratadas em placas de 6 poços foram lavadas com PBS e colocadas sobre o gelo. As células foram lisadas adicionando tampão RIPA contendo inibidores de proteases (Roche) e fosfatases (Roche), e a lise foi auxiliada utilizando *cell*

scraper. O conteúdo foi fervido por 5 minutos. Uma alíquota foi separada para quantificação das proteínas, enquanto o restante do extrato foi misturado com tampão de amostra redutor e congelado a -20°C para posterior detecção e quantificação das proteínas por *western blot*. Protocolo detalhado: Anexo 8.

5.7. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantificação de proteínas seguiu as recomendações do fabricante para o Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). As amostras ou padrões da curva (25 µL) foram incubados com 200 µL de *working reagent* em placas de 96 poços por 30 minutos em banho-maria a 37°C. As absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro de microplacas Epoch (BioTek) em comprimento de onda de 562nm. Os valores obtidos foram comparados aos da curva padrão obtida através de concentrações conhecidas de BSA. Protocolo detalhado: Anexo 9.

5.8. IMUNOMARCAÇÕES POR WESTERN BLOT

Aproximadamente 20 µg de proteínas celulares totais diluídas em tampão de amostra redutor (Tris-HCl 0,3 M pH 6,8, 50% v/v de glicerol, 10% m/v de SDS e 5% v/v de 2-mercaptoetanol) foram separadas eletroforéticamente em gel de poliacrilamida 10% por 4 horas a 30 mA. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose por 2 horas a 100 V. Protocolo detalhado: Anexo 10.

O bloqueio das membranas foi feito em TBST/5% de BSA por 1 hora, seguido da marcação com os anticorpos primários:

- N-caderina (Santa Cruz, sc-31030) – Anexo 15,
- p-AKT 1/2/3 (Ser 473) (Santa Cruz, sc-33437) – Anexo 13,
- AKT 1/2/3 (Santa Cruz, sc-8312) – Anexo 12,
- α-SMA (Sigma-Aldrich, A5228) – Anexo 16,
- β-catenina (Millipore, 06-734) – Anexo 14,
- Actina (Santa Cruz, sc-1616) – Anexo 11.

As membranas foram então lavas 3 vezes por 5 minutos cada, com TBST e incubadas com o anticorpo secundário adequado conjugado com peroxidase por 1 hora à temperatura ambiente:

- HRP-anti-rabbit (Santa Cruz, sc-2004),
- HRP-anti goat (Invitrogen, 611620),
- HRP-anti-mouse (BD, 554002).

As membranas foram lavadas mais 3 vezes com TBST e reveladas usando o kit *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific), seguida de leitura da luminescência das bandas no equipamento *Image Station Solution* (Carestream).

Quando era necessário fazer outra marcação na mesma membrana essa foi desmarcada lavando 5 minutos com H₂O, 10 minutos com NaOH 0,2M e mais 5 minutos com H₂O, iniciando novamente o procedimento de imunomarcação.

5.9. ZIMOGRAMA EM GELATINA POR SDS-PAGE

A determinação da atividade gelatinolítica da enzima MMP-2 liberada no sobrenadante das culturas celulares foi obtida através de 3 passos: 1º) o sobrenadante das culturas celulares pré-tratadas por 96 horas em placas de 24 poços foi substituído por 350 µL de DMEM sem SFB. As células foram incubadas com esse novo meio por 24 horas. 2º) A separação das proteínas liberadas no meio sem SFB foi feita por corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 8% contendo 1 mg/mL de gelatina (Fluka) por 4 horas a 40 mA, usando tampão de amostra não-redutor (Tris-HCl 0,3 M pH 6,8, 50% v/v de glicerol, 10% m/v de SDS). Padrão de peso molecular pré-corado com variação de 3,5 a 260 KDa (Invitrogen) foi usado para localização das bandas. 3º) lavagem dos géis com água ultrapura, seguida de 3 lavagens com triton X-100 2,5% (VETEC) por 10 minutos cada e mais 3 lavagens com água para retirar toda a espuma, incubação com tampão de incubação (0,05 M Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 1 µM ZnCl₂, pH 8,0) por 72 horas em incubadora a 37°C, lavagem com água e coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,5% (VETEC) em 30% de metanol (Merck)/ 10% de ácido acético glacial (Merck)/ 60% água ultrapura por 30 minutos. (TOTH; FRIDMAN). Os géis foram lavados com água ultrapura para retirar o excesso de corante e então escaneados em scanner EPSON A3 Transparency Unit, modelo EU-88, e as bandas referentes à MMP-2 quantificadas usando o programa ImageJ. Protocolo detalhado: Anexo 17.

Para normalização do resultado de atividade gelatinolítica as células dos poços de onde foi retirado o sobrenadante para zimografia foram fixadas e coradas com cristal violeta, como será descrito posteriormente, fornecendo uma informação da quantidade de

células contidas em cada poço. Protocolo detalhado: Anexo 19. A intensidade das bandas dos géis foi então dividida pela absorbância da coloração com cristal violeta da sua respectiva amostra.

5.10. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM ALGINATO

As células plaqueadas e tratadas em placas de 6 poços foram desaderidas com rodinho e contadas. Quinhentos μL de solução contendo $2,5 \times 10^3$ células de cada amostra em DMEM com 10% de SFB e 10% de tampão de endurecimento (Gibco) foram transferidos para placas de 24 poços *AlgiMatrix 3D Culture System* (Gibco). A placa foi centrifugada a 100g por 4 minutos para sedimentação das células na matriz. Posteriormente, foram adicionados mais 500 μL de DMEM com 10% de SFB. As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO_2 por mais 6 dias para formação das colônias, com substituição de todo o meio no terceiro dia. As amostras foram então lavadas com DMEM sem SFB e fixadas em PFA 1% em DMEM overnight a 4°C, coradas com solução de cristal violeta 0,25 mg/mL em H_2O por 1 hora sob agitação, lavadas 3 vezes com H_2O por 30 minutos cada sob agitação. As colônias foram então fotografadas sob lupa em aumento de 2X e contadas usando o programa ImageJ. Protocolo detalhado: Anexo 18.

5.11. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO

As células cultivadas e tratadas em placas de 96 poços foram lavadas com PBS a 37°C, fixadas com *BD Cytofix/Cytoperm kit* (BD Bioscience) por 30 minutos em gelo, coradas com solução aquosa de cristal violeta 0,25mg/ml (EMS) por 10 minutos à temperatura ambiente, seguida de remoção do excesso de corante através de lavagens com água destilada. O corante foi solubilizado das células em ácido acético 33% em água e a absorbância da solução foi determinada em espectrofotômetro de microplacas Epoch (BioTek) em comprimento de onda de 570nm. Os valores obtidos foram comparados aos da curva padrão obtida através de valores de absorbância determinados a partir de número conhecido de células. Para a confecção da curva, foram plaqueadas células em concentração definidas (de 5×10^2 a 5×10^4 células) em placa de 96 poços usando meio DMEM com 3% de SFB para reduzir a capacidade proliferativa das células, deixando aderir por 15 horas a 37°C e 5% de CO_2 , seguido da coloração com cristal violeta da forma descrita anteriormente. A média dos valores de absorbância dos poços brancos (sem células) foi subtraída de todos os valores obtidos na curva e foi gerada uma linha de

tendência utilizando esses valores. A seguinte equação (referente à equação da reta gerada) foi posteriormente utilizada para estimar o número de células dos grupos experimentais: Y (absorbância) = $7 \times 10^{-6} \cdot X$ (número de células). Protocolo detalhado: Anexo 19.

5.12. ENSAIO DE MORTE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para este ensaio foram seguidas as recomendações do fabricante para o *PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Pharmingen). Como controle positivo de morte as células foram incubadas com 10 μ M de camptotecina (SigmaAldrich) durante as 15 últimas horas de cultivo. Resumidamente, foi coletado o sobrenadante de aproximadamente 5×10^5 células cultivadas e tratadas em placas de 6 poços, afim de armazenar as células que, porventura, houvessem morrido e/ou se soltado da placa. Em seguida os poços foram lavados duas vezes com PBS a 37°C e as células desaderidas com tripsina, como descrito no tópico de cultivo celular, e misturadas aos seus respectivos sobrenadantes. Após duas lavagens com PBS gelado, foram incubadas com PE-Anexina V e 7AAD por 15 minutos no escuro e temperatura ambiente. As amostras foram lidas em citômetro de fluxo BD FACSCalibur, utilizando laser 488nm e filtros FL2 (564-601) e FL3 (607LP) e o software CellQuest (BD Biosciences) para a aquisição dos dados. Protocolo detalhado: Anexo 20.

5.13. QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO

O sobrenadante da cocultura feita em placas de 6 poços foi previamente incubado com maxatase (protease maxatase 6 mg/mL, Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15M, pH 7,8) “overnight” a 56°C para degradação de proteínas. As amostras foram fervidas por 20 minutos e então congeladas para posterior quantificação de ácido hialurônico.

A quantificação de ácido hialurônico no sobrenadante da cocultura foi feito através de método fluorimétrico utilizando sondas de ligação a ácido hialurônico, as quais foram gentilmente cedidas pela Dra. Helena Nader (Universidade Federal de São Paulo), e seguindo protocolo descrito previamente. (MARTINS et al., 2003; PEDROSO et al., 2009). Para tal, soluções padrão de diferentes concentrações de ácido hialurônico (0-500 ng/mL) diluídas em tampão de ensaio (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,75 e 1% de BSA) ou das amostras experimentais foram adicionados a placas de ELISA pré-adsorvidas com a sonda

“overnight”. Após incubação a 4°C por 12 horas as placas foram lavadas com tampão de lavagem (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,75), seguida de adição da sonda biotinilada (1 mg/mL) diluída 1:10000 em tampão de ensaio, as placas foram agitadas por 2 horas e então lavadas com tampão de lavagem. Para a revelação foi adicionada streptavidina conjugada com europium diluída 1:10000 (20 ng/mL final) em tampão de ensaio. As placas foram agitadas por 30 minutos e então lavadas com tampão de lavagem. O europium foi solubilizado com solução de *DELFLIA Enhancement Solution* (PerkinElmer) sob agitação por 5 minutos. O europium livre de cada poço foi então lido em fluorímetro Victor 2 (PerkinElmer-Wallac®) (excitação 340nm e emissão a 615nm). Protocolo detalhado: Anexo 21.

A análise foi feita comparando os valores experimentais com curva padrão de concentração ácido hialurônico para determinação da concentração dessa molécula em cada amostra. Posteriormente, esses valores foram normalizados pela quantidade de proteínas celulares (quantificadas usando kit BCA) das respectivas amostras.

5.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Cada experimento foi repetido pelo menos três vezes. Para cada experimento os dados referentes às amostras experimentais (M1 ou M8) foram comparados ao controle (veículo) daquele mesmo experimento. Os dados são mostrados em gráficos de dispersão, onde cada ponto representa a média das replicatas técnicas. (VAUX et al., 2012). Todos os dados obtidos foram submetidos a testes de normalidade, seguido do teste estatístico mais adequado para comparação de dois grupos de dados. (WEISSGERBER et al., 2015). Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE I

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando, já há algum tempo, em estudos de busca de compostos com ação antimelanoma com a linhagem de células de melanoma murino B16-F10. Originalmente, essa linhagem foi selecionada a partir da linhagem B16 pela sua capacidade de gerar metástases pulmonares em animais singênicos C57BL/6. Para isso, células tumorais foram injetadas nos animais para que formassem colônias nos pulmões, sendo que essas foram então coletadas e postas em cultura. Posteriormente, as células expandidas em cultura foram novamente injetadas em animais para que formassem colônias pulmonares, sendo então novamente coletadas. Esse processo foi repetido por dez vezes, o que deu o nome F10 à linhagem obtida. Essa linhagem apresenta propriedades metastáticas bastante estáveis e acentuadas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, com alta especificidade para formação de nódulos nos pulmões (FIDLER, 1975; FIDLER et al., 1976; HART, 1979; RAZ et al., 1980) apresentando-se, portanto, como um modelo de estudo interessante para triagem de compostos com capacidade de redução de características metastáticas em células tumorais.

Na primeira parte do trabalho buscamos dar continuidade ao trabalho de Potrich (2014) de identificação de alterações moleculares e comportamentais em células de melanoma murino B16-F10 resultantes do tratamento *in vitro* diretamente sobre essas células. Tivemos como foco principal inicialmente moléculas envolvidas em processos de adesão célula-célula e/ou célula-MEC, com a intenção de entender a razão para a redução das características migratórias e metastáticas observada nos trabalhos anteriores. Uma vez que nosso objetivo foi compreender os resultados encontrados por Potrich (2014) após tratamento *in vitro* das células de melanoma por 96 horas, adotamos esse mesmo tempo de tratamento para os experimentos seguintes.

6.1. MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE PROGRESSÃO DO MELANOMA

No trabalho de Potrich (2014) sugeriu-se que a redução da capacidade migratória das células B16-F10 fosse resultante da redução da síntese de melanina e dos intermediários dessa via. Entretanto, quando se trata de migração, é de se imaginar que

alterações nesse processo sejam resultantes de alterações em moléculas presentes na superfície celular, as quais interagem com o substrato onde a célula se encontra.

As proteínas conhecidas genericamente como moléculas de adesão são famílias de glicoproteínas de superfície celular com capacidade de interagir fortemente a ligantes específicos. Essas proteínas transmembrana possuem domínio extracelular capaz de reconhecer outras moléculas, e ainda domínio intracelular funcional. No entanto, suas funções vão muito além da simples adesão, uma vez que são capazes de “sentir” o microambiente onde a célula se encontra e enviar informações para as células adjacentes. Portanto, moléculas de adesão possuem papel fundamental na adesão célula-célula e célula-MEC, bem como em processos de migração, diferenciação, sinalização celular e transcrição gênica, tornando de fundamental importância sua investigação em estudos de processos tumorais/cancerígenos. (GOODISON et al., 1999).

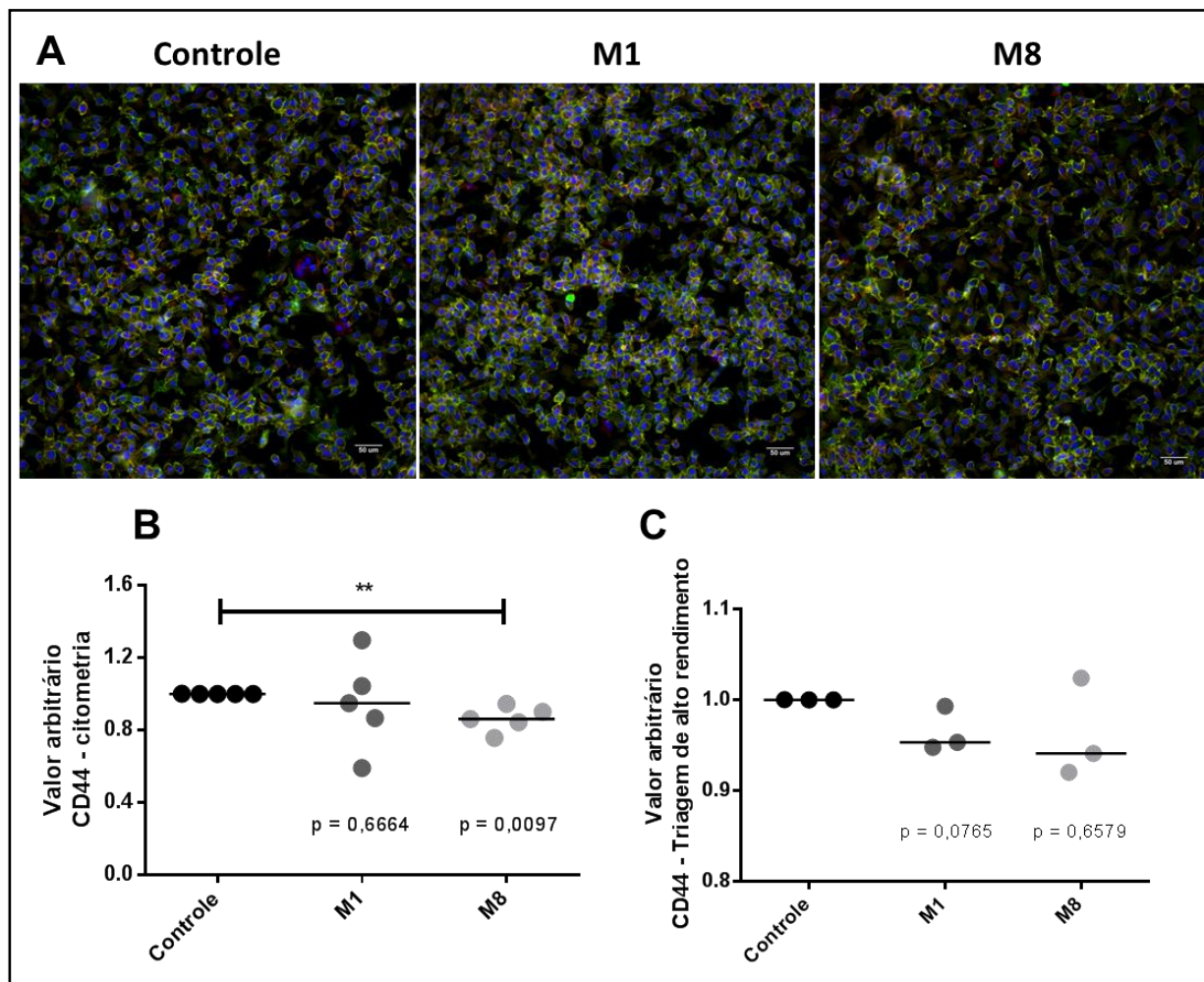
6.1.1. M8 REDUZ A MARCAÇÃO DE B16-F10 PARA CD44

Em 2014, Potrich mostrou que os tratamentos *in vitro* com os CNADs M1 ou M8 reduziram a produção/secreção de ácido hialurônico (AH) pelas células de melanoma, bem como a expressão gênica de enzimas responsáveis pela degradação dessa molécula. Sabe-se que a interação do AH com o CD44 - principal receptor para essa molécula – presente na superfície das células tumorais desencadeia sinais para vários processos importantes para a progressão do melanoma, inclusive estimulando a migração. (SIRONEN et al., 2011). Além disso, em pacientes com melanoma a elevada expressão de CD44 está intimamente relacionada ao alto risco de metástase, bem como à redução da sobrevida. (DIETRICH et al., 1997). Sabendo disso, procuramos verificar através de imunomarcacão para citometria de fluxo e triagem de alto rendimento se a marcação para tal receptor na superfície das células de melanoma seria alterada pelos tratamentos.

O tratamento com M8 reduziu a marcação para CD44 em aproximadamente 15% quando comparado ao controle na análise por citometria de fluxo. Porém, o tratamento com M1 não modificou tal marcação (Figura 5B) nas condições testadas. A vantagem de avaliar a marcação de CD44 também por triagem de alto rendimento é que essa metodologia permite que ao mesmo tempo obtenham-se imagens e quantificação da marcação. O padrão do resultado foi o mesmo quando utilizamos os dois tipos de análise – vide medianas - (Figuras 5B e C), entretanto, apenas na citometria de fluxo a redução

da marcação após tratamento com M8 foi estatisticamente significativa, provavelmente devido ao menor número de amostras avaliadas por triagem de alto rendimento.

FIGURA 5 – MARCAÇÃO DE B16-F10 PARA CD44 APÓS TRATAMENTO COM M1 OU M8



As células foram tratadas com 20% v/v de M1 ou M8 por 96 horas e então marcadas para CD44. A) Células B16-F10 observadas em equipamento de triagem de alto rendimento. Em verde marcação para CD44 e em vermelho para actina. B) Células B16-F10 marcadas para CD44 e analisadas por citometria de fluxo. Foram realizados 5 experimentos independentes. C) Células B16-F10 marcadas para CD44 e analisadas em equipamento de triagem de alto rendimento. Foram realizados 3 experimentos independentes. Para citometria de fluxo, os pontos representam a mediana da intensidade de fluorescência (MFI) comparada ao controle. Para os resultados da triagem de alto rendimento, os pontos representam os valores de intensidade obtidos normalizados pelo número de células de cada amostra. Todos os dados foram comparados com seu respectivo controle. As barras representam a mediana de todos os valores para cada grupo. Teste Mann Whitney. **p<0,01.

FONTE: O autor (2016).

O CD44 pode também ligar-se a diferentes componentes da MEC (além do ácido hialurônico), como colágenos, fibronectina, condroitim sulfatos, etc, (ARUFFO et al., 1990; GOODISON et al., 1999). A inibição da ligação de CD44 ao ácido hialurônico é capaz de reduzir a formação de metástases pulmonares *in vivo* após injeção intravenosa das células e prolongar a sobrevivência de animais portando esses tumores, sugerindo que o CD44 tem um importante papel no estabelecimento de metástases de melanoma no

microambiente pulmonar. (MUMMERT et al., 2003). A expressão de CD44 se intensifica ao longo da progressão do melanoma e sua interação com o ácido hialurônico estimula a proliferação de células de melanoma humano *in vitro* (AHRENS; ASSMANN; et al., 2001) e *in vivo* (AHRENS; SLEEMAN; et al., 2001).

Apesar de a interação entre CD44 e ácido hialurônico ser geralmente o foco de atenção nos estudos de câncer, a função desse receptor vai muito além disso. Essa molécula é capaz também de estimular a produção da metaloproteinase de matriz MMP-2 (processo também abordado nesse trabalho), facilitando a degradação de diferentes componentes da MEC e, conseqüentemente, a capacidade migratória e invasiva de células de melanoma humano de forma independente da ligação ao ácido hialurônico ou seus fragmentos. (TAKAHASHI et al., 1999).

Existem ainda isoformas variantes de CD44 produzidas a partir do mesmo gene, além da isoforma padrão, que quando altamente expressas por células de melanoma podem facilitar o extravasamento dessas células da corrente sanguínea, facilitando a formação de metástases (ZHANG et al., 2014), até mesmo cerebrais (MARZESE et al., 2014). O anticorpo contra CD44 que utilizamos no nosso estudo reconhece um epítopo presente em todas as isoformas dessa molécula, portanto não podemos afirmar qual ou quais isoformas são menos expressas devido ao tratamento com M8.

Portanto, a redução da marcação de CD44 (independente da isoforma) devida ao tratamento com M8 nos fornece um indício do mecanismo de ação desse complexo, alterando a sinalização via AH e seu receptor CD44, justificando assim a redução da capacidade migratória de B16-F10 observada por Potrich (2014) e também da formação de metástases pulmonares, apesar de o CD44 não ter sido investigado *in vivo* por Guimarães (2010). Futuramente, seria interessante avaliar a expressão gênica das diferentes isoformas de CD44 em células de melanoma após o tratamento, a fim de verificar se sua regulação ocorre a nível transcricional e quais as isoformas que são moduladas.

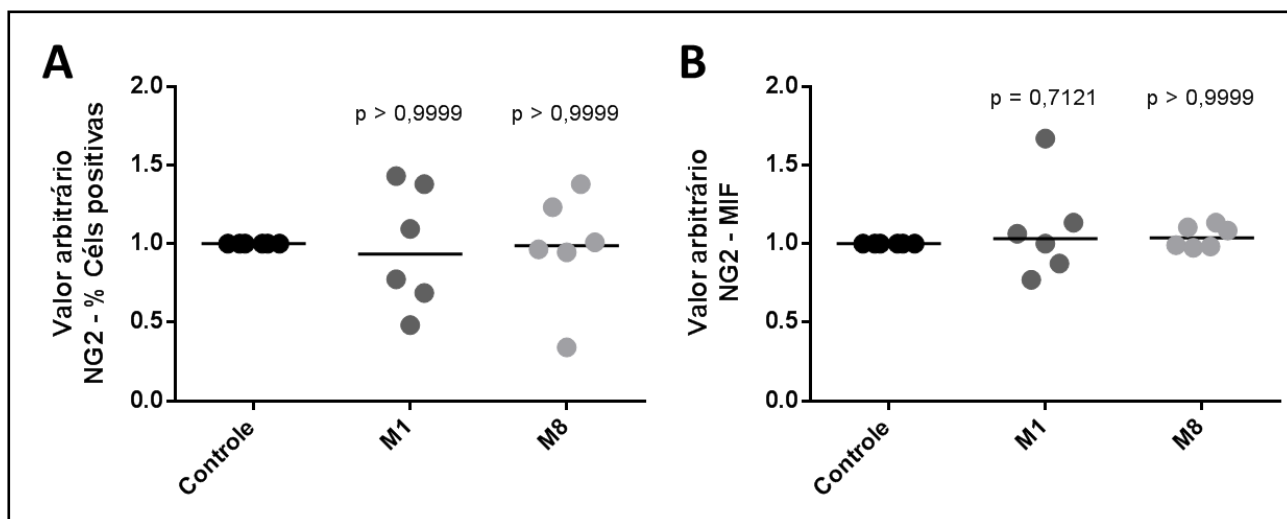
Com relação ao tratamento com M1, o resultado obtido sugere que talvez a sinalização do AH se dê por outra via, uma vez que essa molécula pode se ligar a outros receptores celulares, como *Toll-like receptor-4*, TIAM-1 e RHAMM, por exemplo, estimulando também o processo migratório. (SIRONEN et al., 2011). Dessa forma, essa e outras vias de ação do AH devem ser investigadas na presença de M1 futuramente.

6.1.2. TANTO M1 QUANTO M8 NÃO ALTERAM A MARCAÇÃO DE PGCS4/NG2 EM CÉLULAS B16-F10 APÓS TRATAMENTO

Tendo em vista os resultados anteriores, que mostram que M1 ou M8 são capazes de reduzir o crescimento tumoral e a formação de metástases pulmonares (GUIMARÃES et al., 2010), bem como aumentar a formação de áreas de morte celular nos tumores *in vivo* (FERRARI DE ANDRADE et al., 2016) e também M8 é capaz de reduzir a expressão gênica do proteoglicano de condroitim sulfato 4 (PGCS4/NG2) em células B16-F10 (POTRICH, 2014), resolvemos investigar se esses efeitos finais seriam resultantes da redução da expressão desse proteoglicano na superfície das células de melanoma B16-F10.

Após tratamento com M1 ou M8 foi feita marcação da parte proteica do proteoglicano para análise por citometria de fluxo. Ambos os tratamentos não alteraram a marcação para essa molécula quando comparados ao controle, seja na porcentagem de células que apresentaram marcação para NG2, seja na intensidade da marcação (Figuras 6 A e B).

FIGURA 6 – MARCAÇÃO DE B16-F10 PARA NG2 APÓS TRATAMENTO COM M1 OU M8



As células foram tratadas com 20% v/v de M1 ou M8 por 96 horas e então marcadas para NG2 para análise por citometria de fluxo. A) Porcentagem de células B16-F10 marcadas para NG2. B) Mediana da intensidade de fluorescência (MFI) das células B16-F10 marcadas positivamente para NG2. Foram realizados 6 experimentos independentes. Os pontos representam a porcentagem de células positivas (A) ou a MIF (B) comparada ao controle. As barras representam a mediana de todos os valores para cada grupo. Teste Mann Whitney.

FONTE: O autor (2016).

Apesar de não poder ser considerado um marcador prognóstico para o melanoma, uma vez que também é expresso em melanócitos anteriormente à transformação maligna dos mesmos, a alta expressão de NG2 em melanomas em fase de crescimento radial

está relacionada à facilitação da migração, ativação de proteases e à EMT dessas células, permitindo sua evolução para uma fase de crescimento vertical. Sua presença é ainda capaz de sustentar a ativação de vias de sinalização para sobrevivência e proliferação das células de melanoma, como PI3K/AKT e ERK 1,2. De acordo com os conhecimentos atuais, o PGCS4 não apresenta funções catalíticas intrínsecas, bem como várias outras moléculas de adesão, como o CD44 e as integrinas. Há evidências, entretanto, do seu envolvimento na transdução de sinais nas células, seja atuando como coreceptor de moléculas com atividade de tirosina-quinase ou se associando direta ou indiretamente a quinases intracelulares. O PGCS4 pode ainda interagir com diversas moléculas da MEC, como colágenos, laminina e fibronectina. (PRICE et al., 2011).

A superexpressão dessa molécula em células de melanoma aumenta o espraiamento celular mediado por integrinas e a ativação de ERK 1/2, facilitando os processos de crescimento e invasão tumorais. (YANG et al., 2004). Por outro lado, a redução da expressão de PGCS4 no melanoma faz com que as células passem a proliferar menos, aumentando a apoptose e a necrose dessas células, o que leva à redução do crescimento tumoral. (WANG et al., 2011).

Apesar de Potrich ter observado em seu estudo a redução da expressão gênica do PGCS4 após tratamento com M8, aparentemente 96 horas de tratamento não são suficientes para que isso seja refletido na redução da proteína nas células. Entretanto, vale lembrar que as abordagens realizadas nos nossos estudos não nos permitem saber se o proteoglicano está sendo produzido correta e completamente pelas células, uma vez que o anticorpo reconhece apenas a porção proteica da molécula e a PCR detecta apenas o mRNA, que também é responsável pela construção da parte proteica. Dessa forma, seria interessante averiguar futuramente se os tratamentos com M1 ou M8 seriam capazes de provocar alguma alteração na construção da parte sacarídica da molécula de PGCS4, uma vez que essa porção quando presente em células de melanoma é capaz de se ligar à pró-MMP-2, favorecendo sua ativação pela MT3-MMP, contribuindo também para a invasão e metástase dessas células. (IIDA et al., 2007). De qualquer forma, o resultado obtido aqui sugere que essa molécula não teve papel na redução da migração observada por Potrich (2014), uma vez que a capacidade migratória das células B16-F10 foi avaliada após 96h de tratamento e, portanto, as alterações moleculares responsáveis por essa redução devem ser aquelas passíveis de serem detectadas após o mesmo tempo de tratamento.

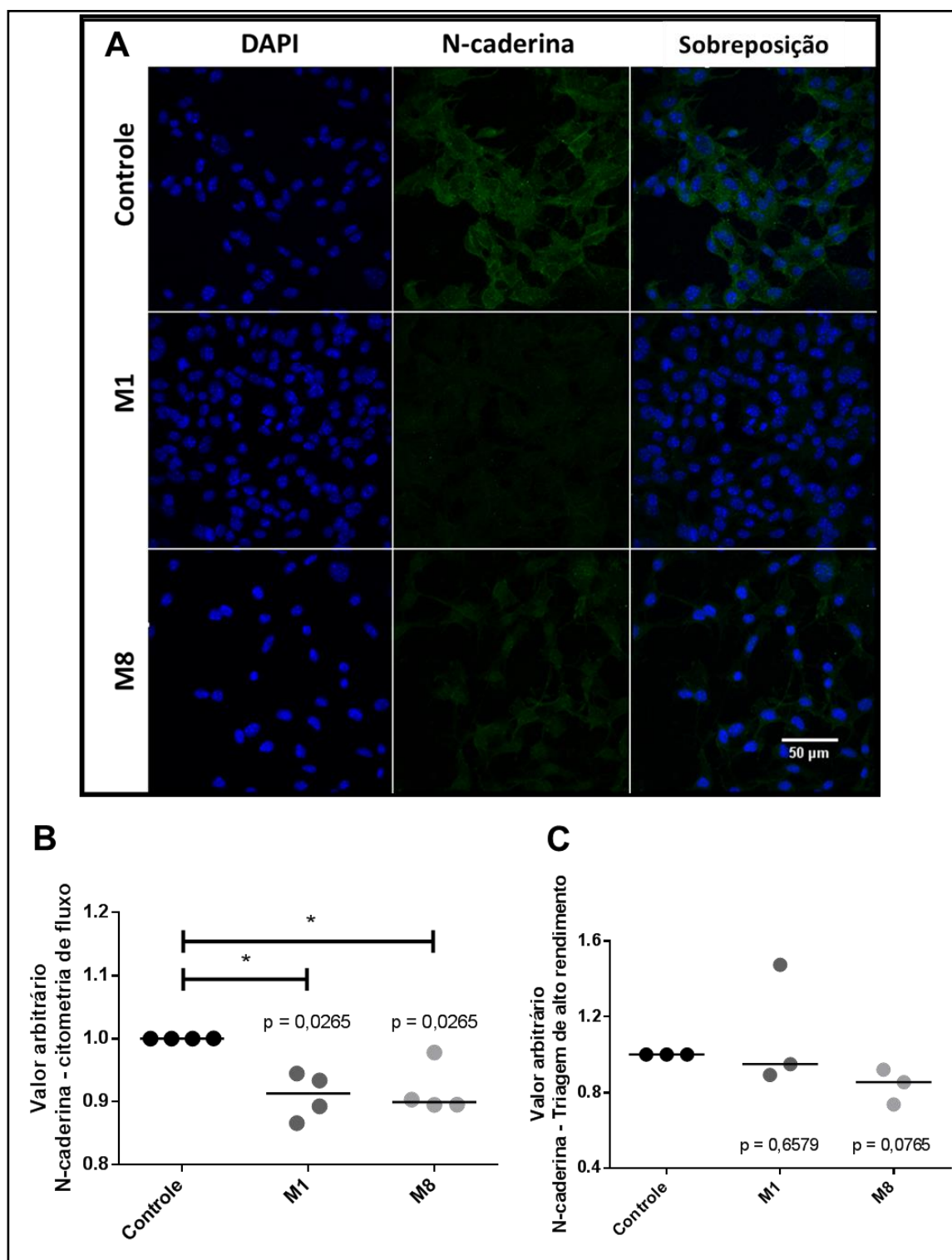
6.1.3. M1 E M8 REDUZEM MARCAÇÃO DE B16-F10 PARA N-CADERINA

Além das moléculas de superfície sugeridas no trabalho de Potrich (2014), várias outras moléculas de adesão são importantes para o processo de progressão do melanoma, especificamente no que diz respeito à migração. Dessa forma, buscamos outras moléculas que pudessem ser alteradas pelos tratamentos com M1 ou M8 e que pudessem justificar a redução da migração. Uma família muito interessante de moléculas de adesão é a das caderinas. Elas são proteínas de adesão célula-célula, cuja integridade e funcionamento dependem da presença de íons cálcio. São as moléculas responsáveis pela integração das muitas células de um organismo em diferentes tecidos, uma vez que células que expressam um determinado tipo de caderina preferem aderir a outras células que expressem esse mesmo tipo. Esse fenômeno é possível devido à característica das caderinas de integrarem o citoesqueleto de actina de uma célula ao domínio extracelular de uma caderina presente na superfície da célula adjacente, processo esse mediado por muitas outras proteínas acessórias. (TAKEICHI, 1990).

Apesar de os melanócitos não serem células de origem epitelial propriamente dita, essas células fazem parte do epitélio e, devido à necessidade de comunicação com os queratinócitos para exercer sua função, expressam moléculas de adesão semelhantes às das células desse tecido. Células de tecidos epiteliais normalmente expressam E-caderina. Entretanto, ao longo de processos de tumorigênese essas células podem sofrer “alternância de caderinas”, ou seja, reduzem ou deixam de expressar E-caderina (característica de células epiteliais) e passam a expressar N-caderina (característica de células mesenquimais), o que as torna mais migratórias e invasivas. Portanto, a alternância de caderinas não é um processo responsável pelo início da neoplasia, mas sim pela aquisição da capacidade metastática. (WHEELLOCK et al., 2008).

Dada a importância do balanço entre E e N-caderinas em processos tumorigênicos, procuramos verificar através de imunomarcacão se os tratamentos com M1 ou M8 alterariam a marcação para N-caderina em células de melanoma. Portanto, realizamos marcações para análise em microscopia confocal, citometria de fluxo e triagem de alto rendimento. Os tratamentos tanto com M1 quanto M8 foram capazes de reduzir visualmente a marcação para N-caderina nas células de melanoma quando observadas na primeira técnica (Figura 7A). A análise quantitativa por citometria de fluxo mostrou que M1 e M8 reduziram a marcação em aproximadamente 8 e 11%, respectivamente, quando comparados ao controle (Figura 7B) após 96h de tratamento.

FIGURA 7 – MARCAÇÃO DE B16-F10 PARA N-CADERINA APÓS TRATAMENTO COM M1 OU M8



As células foram tratadas com 20% v/v de M1 ou M8 por 96 horas e então marcadas para N-caderina. A) Células B16-F10 marcadas para N-caderina e observadas em microscopia confocal. Foram obtidas imagens utilizando objetiva de 60X, barra = 50 μ m. Foi realizado um experimento. B) Células B16-F10 marcadas para N-caderina e analisadas por citometria de fluxo. Foram realizados 4 experimentos independentes. C) Células B16-F10 marcadas para N-caderina, observadas e analisadas em equipamento de triagem de alto rendimento. Foram realizados 3 experimentos independentes. Para citometria de fluxo, os pontos representam a mediana da intensidade de fluorescência (MFI) comparada ao controle. Para os resultados da triagem de alto rendimento, os pontos representam os valores de intensidade obtidos normalizados pelo número de células de cada amostra. Todos os dados foram comparados com seu respectivo controle. As barras representam a mediana de todos os valores para cada grupo. Teste Mann Whitney. *p<0,05.

FONTE: O autor (2016).

O padrão do resultado foi semelhante quando utilizamos os dois tipos de análise quantitativa (citometria de fluxo e triagem de alto rendimento) – vide medianas - (Figuras 7B e C), entretanto, apenas na citometria de fluxo a redução da marcação após tratamento com M1 ou M8 foi estatisticamente significativa, provavelmente devido ao menor número de amostras avaliadas por triagem de alto rendimento.

Como explicado anteriormente, a expressão de N-caderina estimula a migração das células de melanoma. Portanto, a redução da marcação para essa molécula promovida pelos tratamentos com M1 ou M8 justifica o resultado de redução da migração encontrado por Potrich (2014).

No melanoma a alternância de caderinas fornece às células tumorais duas vantagens. Primeiramente, a E-caderina mantém os melanócitos ligados aos queratinócitos da epiderme, os quais exercem rigoroso controle sobre seu crescimento e atividade. Quando os melanócitos já transformados sofrem alternância de caderinas eles deixam de ser controlados pelos queratinócitos e passam a ter mais afinidade pelos fibroblastos da derme, o que favorece a invasão do tecido adjacente. Uma vez na derme, essas células tumorais têm maior probabilidade de acesso aos vasos sanguíneos, cujas células também expressam N-caderina. Portanto, a N-caderina não só facilita o escape das células do tumor primário como também a interação com células endoteliais para adentrar a circulação sanguínea. (LI et al., 2001). Logo, a redução na marcação de N-caderina provocada pelos tratamentos com M1 ou M8 em células de melanoma pode ser um dos fatores que explicam a menor formação de metástases pulmonares vista *in vivo*, uma vez que as células perderam em parte suas moléculas mediadoras da interação com células endoteliais e, conseqüentemente, são menos capazes de ultrapassar a barreira endotelial para chegar aos pulmões.

Além disso, a adesão celular via N-caderina pode ativar a via antiapoptótica AKT (cuja ativação foi também investigada nesse estudo), favorecendo a sobrevivência das células cancerosas. (LI et al., 2001). Uma vez que as células de melanoma tratadas apresentam menos N-caderina, seria de se esperar que essas células passassem a entrar em processo de morte celular. De fato foram vistas mais áreas de morte celular nos tumores sólidos dos animais tratados *in vivo* (ANDRADE et al. 2015), porém Potrich (2014) verificou que tanto M1 quanto M8 não induzem as células B16-F10 à morte *in vitro*. Portanto, o aumento das áreas de morte celular observado *in vivo* talvez seja apenas resultado na menor vascularização encontrada naqueles tumores.

A presença de N-caderina não só regula a ativação de AKT como o contrário também é verdade. Enquanto a via PI3K/AKT encontra-se ativada a expressão de N-

caderina é sustentada a nível transcricional (HAO et al., 2012), o que nos fornece mais uma evidência de que a redução das características metastáticas de células de melanoma provocada pelo tratamento com M1 ou M8 poderia ser resultado da inativação dessa via de sinalização intracelular.

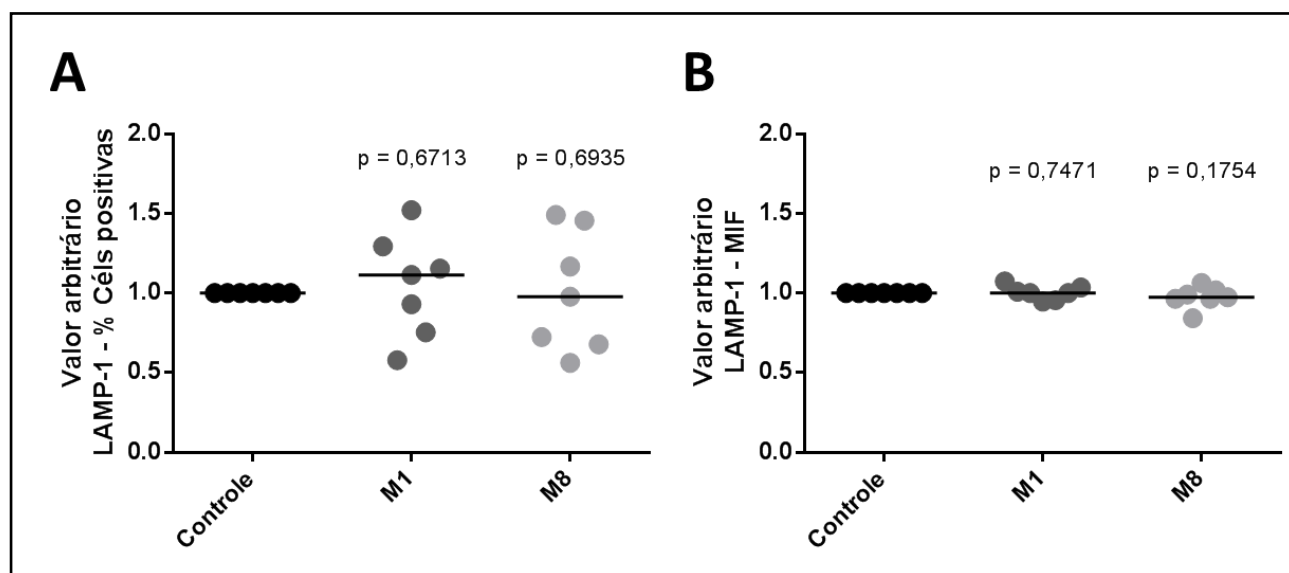
O domínio citoplasmático da N-caderina é conectado a uma gama de outras proteínas acessórias, dentre elas α e β -cateninas, que juntas formam a ligação ao citoesqueleto e consequentemente permitem o posicionamento correto da N-caderina na membrana, assegurando suas funções de adesão e motilidade celular. (DERYCKE; BRACKE, 2004). Quando células de melanoma fazem contato com células endoteliais via N-caderina, essa é fosforilada e acaba liberando a β -catenina, a qual migra para o núcleo e passa a atuar como fator de transcrição, elevando a expressão de genes regulados por ela enquanto a célula cancerosa migra através da parede de células endoteliais. Dentre os genes promotores de invasão que são estimulados pela β -catenina encontram-se os de CD44, MT1-MMP e da própria N-caderina. (QI et al., 2005). A presença de β -catenina nas células de melanoma também é abordada neste trabalho, uma vez que há indícios de que essa via de sinalização esteja sendo afetada pelos tratamentos, pois houve redução tanto de CD44 (apenas M8) quanto de N-caderina (tanto M1 quanto M8), bem como da expressão gênica de MT1-MMP (tanto M1 quanto M8). (POTRICH, 2014). Afim de confirmar se o processo de sinalização descrito acima é realmente alterado pelos tratamentos a expressão gênica de CD44 e N-caderina também devem ser analisadas futuramente.

Outra forma pela qual a presença de N-caderina em células metastáticas as torna mais agressivas é sua ligação ao receptor de FGF na membrana, o que impede a internalização desse receptor após ligação ao fator de crescimento, sustentando a ativação da via MAPK/ERK, que por sua vez promove a transcrição de MMP-9 para subsequente degradação da matriz extracelular e invasão. (SUYAMA et al., 2002). Potrich (2014) mostrou em seu trabalho que tanto M1 quanto M8 reduziram a expressão gênica de MMP-9 nas células de melanoma. Uma vez que os tratamentos também reduziram a quantidade de N-caderina, talvez o mecanismo de ação desses complexos compreenda a desativação da via MAPK/ERK. Infelizmente não foi possível averiguar a ativação dessa via no presente trabalho, uma vez que o anticorpo utilizado não apresentou boa marcação, portanto não conseguimos quantificar essas moléculas através de imunomarcação por *western blot*.

6.1.4. TANTO M1 QUANTO M8 NÃO ALTERAM A MARCAÇÃO DE LAMP-1 EM CÉLULAS B16-F10 APÓS TRATAMENTO

LAMP-1 (do inglês *lysosomal-associated membrane protein 1*) é originalmente conhecida por ser uma glicoproteína transmembrana da família das glicoproteínas associadas aos lisossomos. Entretanto, recentemente observou-se que a presença de LAMP-1 na superfície de células de melanoma é fundamental para sua capacidade metastática. Quanto maior a quantidade dessa molécula na superfície dessas células maior sua capacidade adesiva e migratória sobre diversas moléculas da matriz extracelular, inclusive de membrana basal. (AGARWAL et al., 2014). Daí nosso interesse em investigar se os tratamentos com M1 ou M8 afetam a exposição de LAMP-1 na superfície celular de células B16-F10, o que foi estudado através de marcação externa para citometria de fluxo. Ambos os tratamentos não alteraram significativamente a porcentagem de células apresentando LAMP-1 em sua superfície, bem como a intensidade da marcação nessas células (Figuras 8 A e B, respectivamente). Esse resultado sugere, portanto, que a exposição de LAMP-1 na superfície de B16-F10 não tem relação com a redução da migração observada por Potrich (2014).

FIGURA 8 – MARCAÇÃO DE B16-F10 PARA LAMP-1 APÓS TRATAMENTO COM M1 OU M8



As células foram tratadas com 20% v/v de M1 ou M8 por 96 horas e então marcadas para LAMP-1 para análise por citometria de fluxo. A) Porcentagem de células B16-F10 marcadas positivamente para LAMP-1. B) Mediana da intensidade de fluorescência (MFI) das células B16-F10 marcadas positivamente para LAMP-1. Foram realizados 7 experimentos independentes. Os pontos representam a porcentagem de células positivas (A) ou a MIF (B) comparada ao controle. As barras representam a mediana de todos os valores para cada grupo. Teste Mann Whitney. FONTE: O autor (2016).

Por se tratar de uma molécula altamente glicosilada, LAMP-1 oferece vários sítios de ligação para lectinas endógenas, como a galectina-3, por exemplo. Essa última apresenta-se em grandes quantidades em todas as regiões dos pulmões, o que justifica a alta afinidade de células B16-F10 (as quais apresentam forte marcação para LAMP-1 em sua superfície e são muito metastáticas) por esse órgão, enquanto células com menor capacidade metastática como as B16F1 não demonstram tal característica, uma vez que apresentam menores quantidades de LAMP-1 na superfície. (AGARWAL et al., 2014, 2015). Uma vez que a galectina-3 está fortemente presente no endotélio vascular dos pulmões, o LAMP-1 pode servir como âncora para o estabelecimento das células de melanoma nesse órgão. (KRISHNAN et al., 2005). Além disso, a ligação à galectina-3 mediada por LAMP-1 em células de melanoma estimula a síntese de MMP-9, facilitando ainda mais no processo de invasão. (DANGE et al., 2015).

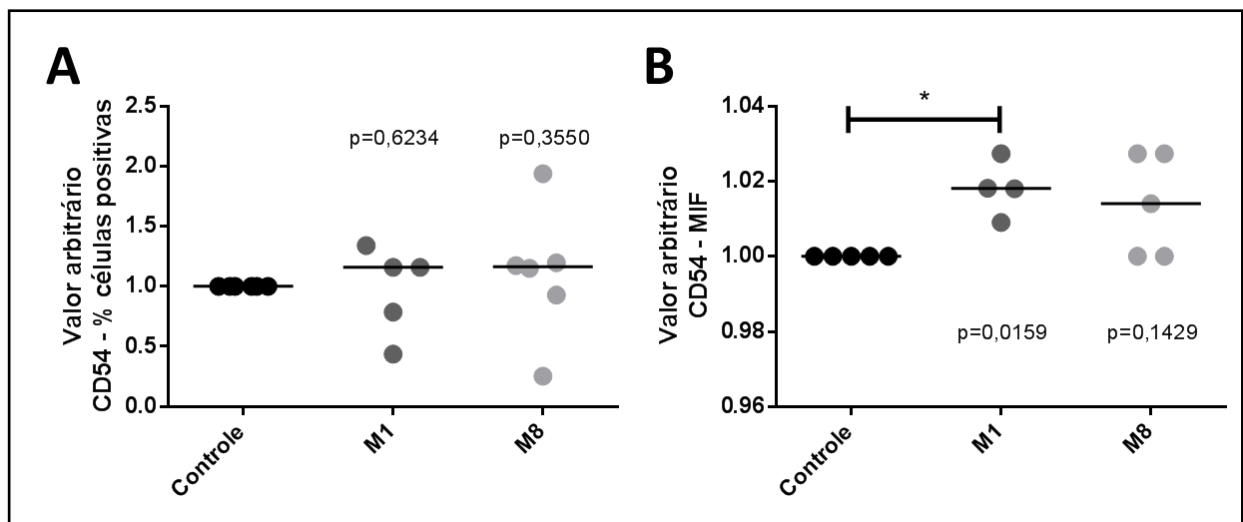
Sabendo que os tratamentos com M1 e M8 são capazes de reduzir drasticamente a formação de metástases de melanoma nos pulmões *in vivo* e também a expressão gênica de MMP-9 pelas células B16-F10 *in vitro*, suspeitamos que alterações na exposição de LAMP-1 na superfície dessas células pudessem ser responsáveis por tais fenômenos. Entretanto, ambos os tratamentos não causaram alterações dessa característica celular, o que é justificável, uma vez que apenas M1 foi capaz de reduzir sutilmente a marcação dessas células com lectina (POTRICH, 2014), mostrando que provavelmente os efeitos *in vivo* dos tratamentos não se devem a alterações na exposição de sítios de ligação para lectinas endógenas na superfície das células de melanoma, mas sim de outras moléculas de adesão, como discutido anteriormente.

6.1.5. M1 AUMENTA A MARCAÇÃO DE CD54 EM CÉLULAS B16-F10 APÓS TRATAMENTO

Outra molécula, que não tem relação com o processo de migração, mas é também muito importante no contexto do melanoma é o CD54, ou ICAM-1 (do inglês *intercellular adhesion molecule 1*). Essa molécula de superfície é encontrada em aproximadamente 90% das lesões de melanoma metastático, sendo que 65% das células dessas lesões a expressam. (KAGESHITA et al., 1993). A elevada expressão de CD54 em lesões malignas quando comparadas às primárias parece ser específica para o melanoma, uma vez que não foram encontradas diferenças semelhantes em diversos outros tipos de câncer. (NATALI et al., 1990).

Dada sua importância no melanoma, resolvemos investigar através de citometria de fluxo se os tratamentos com M1 ou M8 alterariam a marcação das células B16-F10 para o CD54. Curiosamente, o tratamento com M1 promoveu o aumento da intensidade da marcação para essa molécula (Figura 9B). Já o tratamento com M8 não o fez (Figura 9B). Ambos tratamentos não afetaram a porcentagem de células que expressam esse marcador (Figura 9A).

FIGURA 9 – MARCAÇÃO DE B16-F10 PARA CD54 APÓS TRATAMENTO COM M1 OU M8



As células foram tratadas com 20% v/v de M1 ou M8 por 96 horas e então marcadas para CD54 para análise por citometria de fluxo. A) Porcentagem de células B16-F10 marcadas para CD54. B) Mediana da intensidade de fluorescência (MFI) das células B16-F10 marcadas positivamente para CD54. Os pontos representam a porcentagem de células positivas (A) ou a MIF (B) comparada ao controle. As barras representam a mediana de todos os valores para cada grupo. Teste Mann Whitney. *p<0,05.

FONTE: O autor (2016).

O CD54 pode existir tanto nas formas ligada à membrana plasmática como solúvel. Pacientes com melanoma de estágios III e IV apresentam níveis significativamente mais altos da forma solúvel no soro, cujos níveis aumentam progressivamente ao longo da evolução da doença. (KAGESHITA et al., 1993). O equilíbrio entre benefícios e prejuízos da presença do CD54 nas células de melanoma é bastante controverso na literatura. Por um lado, parece interessante tê-lo na membrana das células de melanoma, uma vez que o CD54 é reconhecido pelo CD11a presente na membrana de linfócitos NK (do inglês *natural killer*), permitindo que a célula tumoral seja induzida à morte por sinais enviados pelo linfócito. (MIELE et al., 1994). Entretanto, Giavazzi e colaboradores (1992) sugerem que a interação de células tumorais com células citotóxicas resultante da elevada expressão de CD54 pelas primeiras possa gerar mediadores inflamatórios suficientes para danificar o tecido, facilitando assim a dissociação do tumor primário e, conseqüentemente, o escape das células cancerosas, que podem então migrar e formar

metástases. Os autores sugerem também que a presença de agregados formados por células tumorais e linfócitos em capilares teciduais poderia prender essas células no local, permitindo a formação de metástases. Ou ainda que a grande quantidade da forma solúvel da molécula poderia saturar os receptores dos linfócitos, impedindo assim o reconhecimento imunológico (GIAVAZZI et al., 1992), uma vez que a forma solúvel de CD54, bem como anticorpos monoclonais contra essa molécula são capazes de inibir a lise do melanoma pelas células NK *in vitro* (ALTOMONTE et al., 1993). O quadro pode ser ainda pior se considerarmos que a liberação da forma solúvel acompanha o aumento da expressão da molécula. (SCHEIBENBOGEN et al., 1993).

Interessantemente, *in vivo* a ação do M1 parece ser independente da imunidade inata e adaptativa mediada por linfócitos, uma vez que o tratamento em camundongos deficientes para linfócitos T, B e NK continuou apresentando efeito anti-melanoma. (FERRARI DE ANDRADE, 2014). Apesar dos tantos malefícios que o aumento da expressão de CD54 pelas células de melanoma pode acarretar, nosso modelo de estudo é bastante limitado, uma vez que estamos investigando unicamente a célula cancerosa isolada. Vale lembrar que o tratamento *in vivo* dos animais com M1 levou ao aumento das áreas de morte celular no interior dos tumores sólidos, bem como à redução da formação de metástases pulmonares. (FERRARI DE ANDRADE et al., 2016). Portanto, caso esse aumento da expressão de CD54 se mantiver *in vivo*, possivelmente isso se deva ao “represamento” das moléculas presas à membrana plasmática das células tumorais, evitando sua liberação na forma solúvel, e essa resposta seja rápida o suficiente para que os linfócitos NK reconheçam de forma mais eficiente as células de melanoma, auxiliando sua morte antes que se forme uma inflamação excessiva a ponto de favorecer o extravasamento das células tumorais. Considerando o pequeno aumento na intensidade de marcação de CD54 gerado pelo tratamento com M1 (apenas 2%), talvez essa característica possa ser responsável por uma pequena parcela do resultado final observado após tratamento dos animais.

Além dos linfócitos NK, monócitos e macrófagos também são capazes de reconhecer o CD54 em células tumorais, induzindo-as à morte, o que se dá através do pareamento de CD11a e LFA-1 (integrina $\beta 2$ ou CD18) presentes na célula monocítica. (KLIMP et al., 2002). Dessa forma, o pequeno aumento na marcação de CD54 promovido pelo tratamento das células de melanoma com M1 poderia resultar na melhoria do reconhecimento dessas células por ambas as classes de células do sistema imunológico, levando-as à morte de forma mais eficiente.

6.2. MOLÉCULAS ENVOLVIDAS EM VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULARES IMPORTANTES PARA A PROGRESSÃO DO MELANOMA

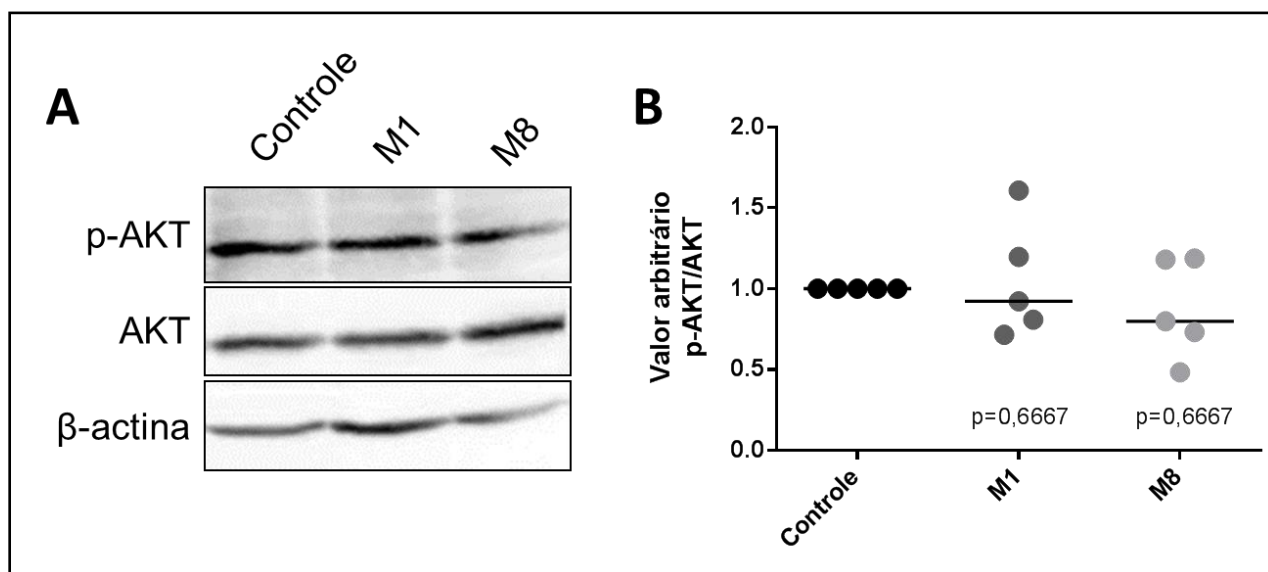
Além de buscar por alterações em moléculas de adesão que justificassem os resultados obtidos anteriormente após tratamentos com M1 ou M8, outro desafio do presente trabalho foi buscar por vias de sinalização que pudessem estar sendo moduladas pelo tratamento com os complexos a fim de gerar tais mudanças. Se considerarmos que células tumorais apresentam ativação constitutiva de diversas vias de sinalização devido às mutações em componentes dessas vias, muitas seriam as possibilidades de alvos a serem estudados. Entretanto, no contexto do melanoma tem-se dado bastante importância à via PI3K/AKT. Essa família de quinases é responsável pela hiperfosforilação de fosfoinosítídeos, que são lipídeos de membrana, convertendo-os em segundos mensageiros intracelulares (como PIP3, por exemplo), os quais ativam várias outras vias efetoras. O término da sinalização se dá pela fosfatase PTEN. (GRAY-SCHOPFER et al., 2007).

6.2.1. TANTO M1 QUANTO M8 NÃO ALTERAM A ATIVAÇÃO DE AKT EM CÉLULAS B16-F10 APÓS TRATAMENTO

Tendo em vista que M1 e M8 reduziram a capacidade migratória, a produção de melanina e proteínas relacionadas à síntese do pigmento (MITF e tirosinases), a expressão de integrina β -1 (POTRICH, 2014), bem como a marcação de N-caderina em B16-F10 e sabendo-se que esses fatores são regulados pela via da PI3K (SLOMINSKI et al., 2004; PRICE et al., 2011), suspeitamos que essa via estivesse sendo desativada pelo tratamento *in vitro* com M1 ou M8. Dessa forma, buscamos verificar por *western blot* se a razão entre AKT fosforilada (que constitui sua forma ativa) e AKT total seria alterada em B16-F10 após os tratamentos. Curiosamente, ambos tratamentos com M1 ou M8 não alteraram o padrão de fosforilação/ativação de AKT nas condições estudadas (Figura 10).

Frequentemente a progressão maligna causada pela mutação de RAF (muito comum em melanomas) se dá pelo silenciamento do supressor tumoral PTEN, fosfatase reguladora da ativação de AKT por PIP3, que se encontra inativo por mutação ou metilação em 12% dos melanomas, tornando essa via hiperativa em grande parte dos casos. A fosforilação de AKT no melanoma leva à proliferação celular e à sinalização anti-apoptótica através de mTOR e NF κ B. RAS pode também ativar PI3K, levando ao aumento da atividade da AKT. (YAJIMA et al., 2012).

FIGURA 10 – RAZÃO p-AKT/AKT EM B16-F10 APÓS TRATAMENTO COM M1 OU M8



As células foram tratadas com 20% v/v de M1 ou M8 por 96 horas e então suas proteínas totais foram extraídas. As proteínas foram separadas eletroforicamente, transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a imunomarcações com anticorpos específicos contra A) p-AKT (Ser 473), AKT ou β-actina. A revelação das marcações foi feita por quimioluminescência e as bandas quantificadas usando o programa ImageJ. Primeiramente, a intensidade das marcações para p-AKT e AKT foi normalizada pela intensidade de marcação para β-actina. Posteriormente, a marcação de p-AKT foi dividida pela de AKT e B) os valores obtidos dessa razão para as amostras tratadas com M1 ou M8 foram comparadas aos do controle. Os pontos representam a razão p-AKT/AKT normalizada pela β-actina e comparada ao controle. As barras representam a mediana entre os pontos. Foram feitos 5 experimentos independentes. Teste Mann-Whitney. FONTE: O autor (2016).

A desativação induzida de AKT em células de melanoma é capaz de reduzir sua capacidade migratória e de formar colônias e ainda sensibilizar essas células ao tratamento com quimioterápicos. (GRABACKA et al., 2006). Por outro lado, a hiperfosforilação de AKT pode inibir a síntese de melanina nessas células, bem como das moléculas envolvidas nesse processo, como tirosinases e MITF. (LEE et al., 2012). A via quando ativada pode ainda fosforilar MITF, levando à sua degradação e redução da síntese de melanina (OH et al., 2010). Esta inativação de MITF pela via da PI3K se dá pela fosforilação de AKT e GSK-3β, que leva à ativação e inativação das mesmas, respectivamente (LEE et al., 2007).

Portanto, o resultado obtido aqui sugere que não seja essa via de sinalização (ou pelo menos não seja AKT) responsável pela alteração na capacidade migratória das células de melanoma observada por Potrich (2014). Entretanto, a manutenção da ativação da via PI3K/AKT justifica o fato de os tratamentos com M1 ou M8 não levarem as células à apoptose, uma vez que essa via quando ativa bloqueia a morte, fazendo com que as células permaneçam no ciclo celular. De qualquer forma, vale lembrar que a via de sinalização em questão apresenta muitos outros componentes além da molécula de AKT, os quais ainda não foram investigados na presença dos tratamentos. Dessa forma, antes

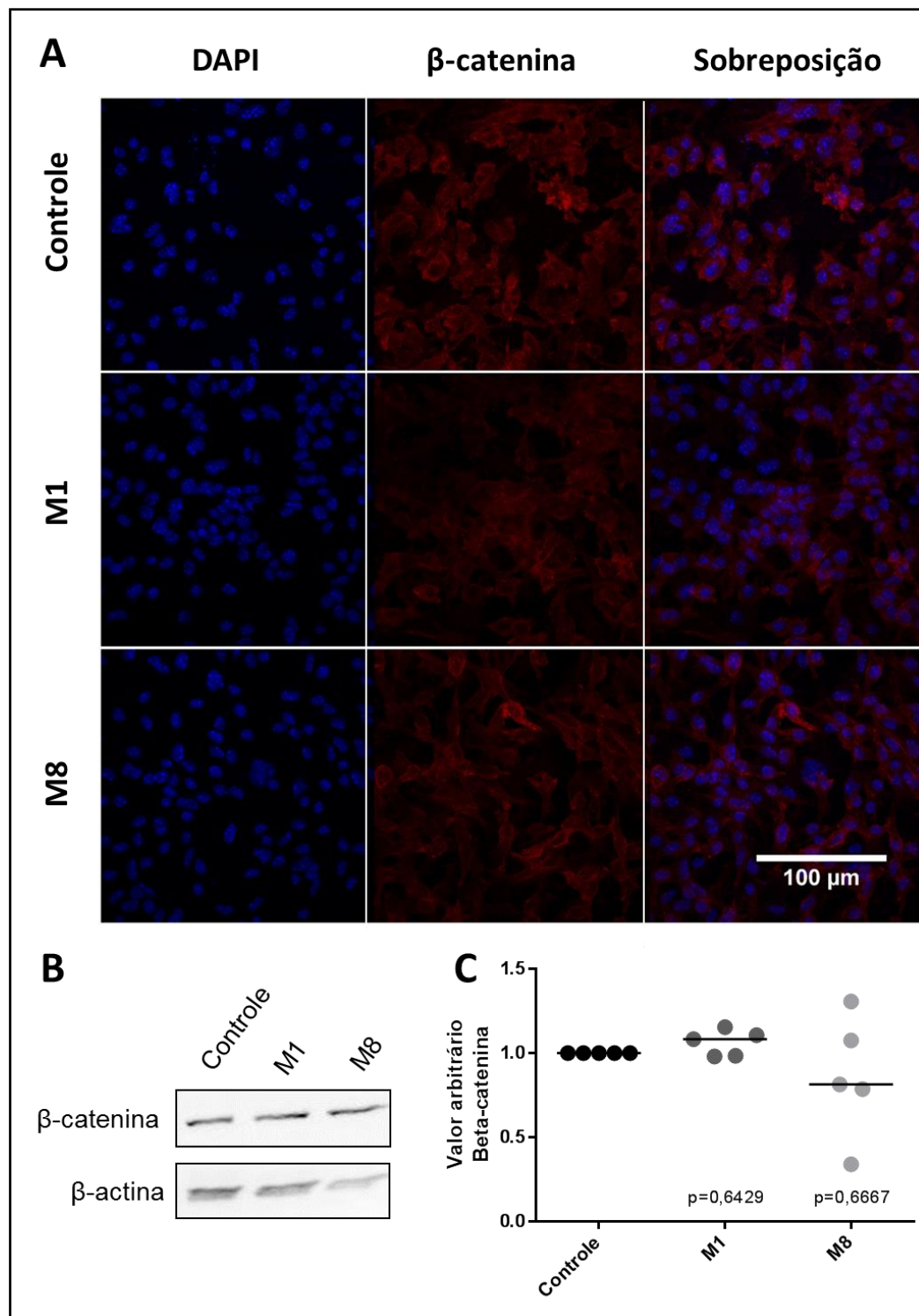
de descartar a possibilidade de envolvimento dessa via na alteração da capacidade migratória de B16-F10 outras moléculas localizadas abaixo na via devem ser estudadas.

6.2.2. TANTO M1 QUANTO M8 NÃO ALTERAM A MARCAÇÃO PARA β -CATENINA EM CÉLULAS B16-F10 APÓS TRATAMENTO

Como descrito anteriormente, a molécula de β -catenina tem papel celular na integração do citoesqueleto à membrana através de ligação a moléculas de adesão, como as caderinas. Classicamente, a β -catenina liberada dos complexos de adesão na membrana plasmática é prontamente sequestrada por complexos proteicos no citoplasma, os quais a fosforilam e depois ubiquitinam, direcionando-a para degradação. (ATKINSON et al., 2015). Entretanto, moléculas de β -catenina livres no citoplasma podem participar de diversas vias de sinalização, até mesmo da via PI3K/AKT discutida anteriormente. Sabendo disso, a fim de verificar se os tratamentos com M1 ou M8 alteram o padrão de marcação das células B16-F10 para β -catenina, uma vez que houve aumento da marcação dessa molécula nos nódulos tumorais no pulmão (FERRARI DE ANDRADE et al., 2016), foram feitas imunomarcações para análise qualitativa por microscopia confocal e quantitativa por *western blot*. A princípio não houve alterações evidentes na distribuição da marcação em microscopia confocal (Figura 11A), bem como na quantidade dessa molécula nas células após os tratamentos (Figura 11B).

Quando a via Wnt/ β -catenina encontra-se ativada as proteínas sequestradoras de β -catenina no citoplasma são saturadas pela ligação a outras proteínas, impedindo a degradação de moléculas de β -catenina recém-sintetizadas, as quais podem ser direcionadas para o núcleo da célula, onde atuam como fatores de transcrição. (ATKINSON et al., 2015). O resultado obtido na microscopia confocal, após tratamento com M1 ou M8, sugere que não há alteração na distribuição da molécula em questão. Entretanto, futuramente seria interessante uma análise qualitativa mais refinada das imagens para determinar a localização da β -catenina dentro das células, uma vez que sua atuação pode variar de acordo com a localização nuclear ou não.

Existem controvérsias na literatura a respeito do papel da via Wnt/ β -catenina no melanoma. Entretanto, há várias evidências do desligamento dessa via ao longo da progressão da doença, como redução da expressão de β -catenina e da sua localização nuclear. E ainda que a presença dessa molécula no núcleo seria inversamente proporcional à proliferação celular, ou seja, com o desligamento da via haveria menor translocação nuclear de β -catenina e consequentemente maior proliferação. Há

FIGURA 11 – MARCAÇÃO PARA β -CATENINA EM B16-F10 APÓS TRATAMENTO COM M1 OU M8

As células foram tratadas com 20% v/v de M1 ou M8 por 96 horas e então processadas para microscopia confocal ou extração de proteínas totais. A) Células B16-F10 marcadas para β -catenina e observadas em microscopia confocal. Foram obtidas imagens utilizando objetiva de 60X, barra = 50 μ m. Foi realizado um experimento. B) As proteínas celulares totais foram separadas eletroforéticamente, transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a imunomarcações com anticorpos específicos contra β -catenina ou β -actina. A revelação das marcações foi feita por quimioluminescência e as bandas quantificadas usando o programa ImageJ. Primeiramente, a intensidade das marcações para β -catenina foi normalizada pela intensidade de marcação para β -actina. Posteriormente, os valores obtidos dessa razão para as amostras tratadas com M1 ou M8 foram comparadas aos do controle. C) Os pontos representam a razão β -catenina/ β -actina comparada ao controle. As barras representam a mediana entre os pontos. Foram feitos 5 experimentos independentes. Teste Mann-Whitney.

FONTE: O autor (2016).

evidências também de que a ativação farmacológica dessa via no melanoma seria responsável pela redução da proliferação e migração, aumento da diferenciação celular e redução do crescimento tumoral e formação de metástases. (ATKINSON et al., 2015). Corrobora com essa linha de raciocínio a informação de que o desenvolvimento e progressão do melanoma envolvem a redistribuição da β -catenina para a membrana da célula, dado obtido do estudo de grande número de amostras de tumores de melanoma em diferentes estágios de progressão. (ROSNER et al., 2014). A β -catenina nuclear é capaz de induzir a expressão de MTIF, uma proteína específica de melanócitos e células de melanoma, que por sua vez suprime a característica morfológica invasiva das células de melanoma e também interfere negativamente na síntese de MT1-MMP, afetando o processo de invasão nessas células. (AROZARENA et al., 2011).

Por outro lado há trabalhos demonstrando que durante a progressão do melanoma ocorre aumento na ativação da via dependente de β -catenina e que o seu desligamento induzido em células de linhagens de melanoma metastático induz apoptose, inibe a proliferação, migração e invasão *in vitro* e reduz a resistência a quimioterápicos, além de praticamente inibir o crescimento de tumor subcutâneo. (SINNBERG et al., 2011).

No caso de células de melanoma da linhagem B16 a ativação dessa via parece promover melhora no prognóstico da doença, levando à redução da proliferação, crescimento tumoral e formação de metástases. (CHIEN et al., 2009). De encontro com as controvérsias da literatura sobre o assunto, Potrich (2014) observou redução da expressão gênica de MTIF em B16-F10 após tratamento com M1 ou M8, o que seria um sinal da inativação da via da β -catenina, enquanto Ferrari de Andrade (2016) observou que a redução do crescimento tumoral e formação de metástases *in vivo* após o tratamento com M1 seria resultado da ativação dessa via, uma vez que foi observada maior marcação para β -catenina nos cortes histológicos dos tumores derivados de animais tratados. De qualquer maneira, os resultados encontrados até agora *in vitro* parecem não ser resultantes de alterações provocadas sobre vias que controlam a β -catenina quando do tratamento com M1 ou M8 diretamente sobre as células de melanoma. Provavelmente, as alterações de expressão gênica encontradas por Potrich (2014) se devam à regulação de outras vias. Assim como o aumento na expressão de β -catenina observado *in vivo* possivelmente seja devido à atuação do tratamento sobre algum processo que envolva mais células presentes no ambiente tumoral além das células cancerosas propriamente ditas.

De acordo com os resultados obtidos até agora ainda não foi possível decifrar qual ou quais vias de sinalização intracelulares são modificadas em resposta ao tratamento

com M1 ou M8. Entretanto, várias outras vias encontram-se frequentemente alteradas em células de melanoma e devem ser estudadas futuramente na tentativa de descobrir os mecanismos que levam aos efeitos finais já observados após esses tratamentos, tanto *in vitro* como *in vivo*.

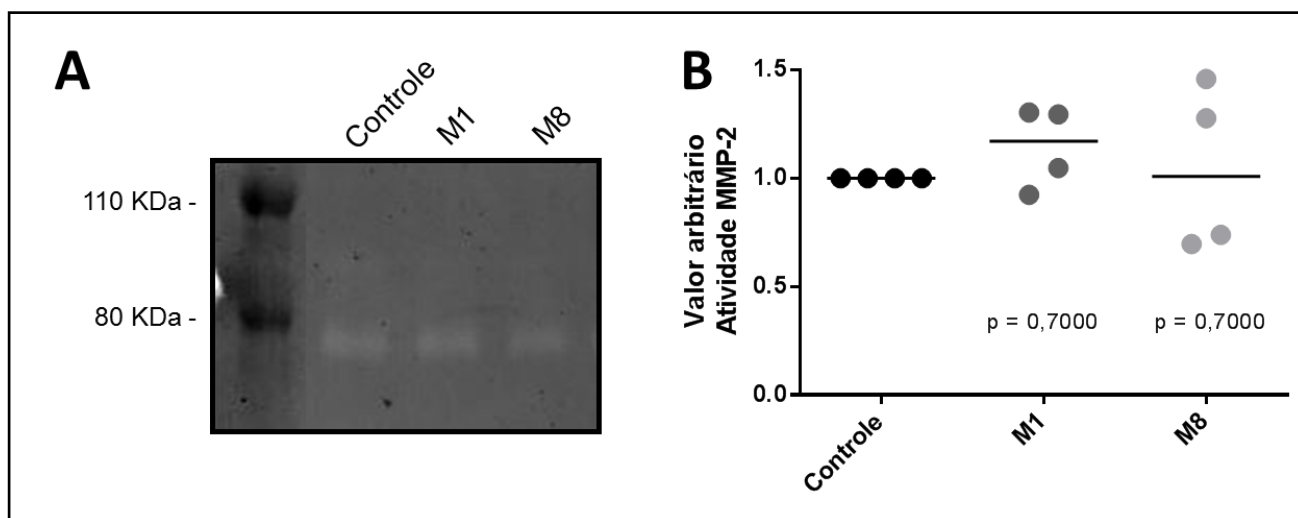
6.3. ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DA MMP-2

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas que dependem de íons zinco para seu funcionamento. Elas geralmente são secretadas pelas células para agir no ambiente extracelular. Entretanto, alguns tipos podem ser encontrados presos à membrana plasmática das células. As grandes classes de MMPs são: collagenases, gelatinases, estromelisinases e matrilisinases e as de membrana. (MORO et al., 2014).

6.3.1. TANTO M1 QUANTO M8 NÃO ALTERAM A ATIVIDADE DA MMP-2 SECRETADA POR B16-F10 APÓS TRATAMENTO

Considerando que a sinalização via ligação do AH aos receptores na membrana de células tumorais acaba por estimular a síntese de metaloproteases por essas células, levando à facilitação da invasão (VOELCKER et al., 2007), e que o tratamento com M8 reduz tanto a síntese do AH, como a marcação para seu principal receptor (CD44) em B16-F10, bem como M1 ou M8 reduzem a expressão gênica de MMP-2, 9 ou MT1-MMP (POTRICH, 2014), suspeitamos que esse pudesse ser o (ou um dos) mecanismo de ação desses complexos nas células de melanoma. Portanto, procuramos verificar se a atividade dessas enzimas, além da expressão gênica, também seria modificada. Para tal, o ensaio de zimograma em gelatina por SDS-PAGE foi utilizado para quantificar a atividade das MMPs secretadas no sobrenadante das culturas. O resultado esperado era a aparição de bandas correspondentes às MMPs 2 e 9, entretanto pudemos observar apenas as bandas correspondentes à MMP-2. Os tratamentos com M1 ou M8 não alteraram a atividade da MMP-2 secretada pela B16-F10 (Figura 12) após 96h de tratamento. Acreditamos que a banda correspondente à MMP-9 não apareceu porque talvez a gelatina usada como substrato para ação das enzimas não seja a mais ideal para sua atividade. Vale lembrar que gelatina é o resultado da degradação de moléculas de colágeno, e como existem dezenas de colágenos diferentes, consequentemente há vários tipos de gelatinas resultantes. Por esse motivo seria interessante futuramente usar gelatinas de origens diferentes a fim de conseguir detectar a atividade da MMP-9 também.

FIGURA 12 – ATIVIDADE DA MMP-2 SECRETADA POR B16-F10 APÓS TRATAMENTO COM M1 OU M8



As células foram tratadas com 20% v/v de M1 ou M8 por 96 horas em placas de 24 poços. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por 300 μ L de DMEM sem SFB e incubado na presença das células B16-F10 pré-tratadas por mais 24h para que secretassem as MMPs no sobrenadante, o qual foi então coletado e misturado com tampão de amostra não-redutor. A) As proteínas desse sobrenadante foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% contendo 1 mg/mL de gelatina. Os géis foram incubados em tampão ótimo para o funcionamento de MMPs por 72h e posteriormente corados com Coomassie para revelação das bandas onde a gelatina havia sido degradada pela ação da gelatinase MMP-2. A intensidade das bandas foi quantificada usando o software ImageJ. Para normalização do resultado as células aderidas às placas foram fixadas e coradas com cristal violeta a fim de estimar o número de células de cada amostra. B) Portanto, a intensidade da banda do gel foi primeiramente normalizada pela absorbância do cristal violeta da sua respectiva amostra e, posteriormente, esse valor de cada amostra foi comparado ao seu respectivo controle de cada experimento. Foram realizados 4 experimentos independentes. Os pontos representam a intensidade das bandas já normalizadas pelo cristal violeta e comparada ao controle. As barras representam a mediana dentre os pontos. Teste Mann-Whitney.

FONTE: O autor (2016).

A degradação e o remodelamento da matriz extracelular são fundamentais para todos os passos necessários para que as células tumorais possam escapar do seu local de origem, adentrar vasos sanguíneos/linfáticos e invadir outros tecidos para a formação de tumores secundários/metástases. As MMPs geralmente são produzidas pelas células e liberadas na sua forma inativa (pró-MMP), que precisa ser clivada a fim de remover uma parte da molécula que cobre seu sítio ativo, tornando-a então funcional. (HOFMANN et al., 2000).

A ativação da pró-MMP-2 liberada pelas células se dá na membrana plasmática. Interessantemente, TIMP-2 (um inibidor de MMPs) quando ligado à MT1-MMP na membrana forma um complexo que atua como receptor para a pró-MMP-2, a qual é então recrutada para esse ponto, onde é clivada e ativada por moléculas de MT1-MMP livres, ou seja, que não fazem parte do complexo de recrutamento. Esse fenômeno costuma acontecer na membrana dos invadopódios das células tumorais, os quais estão localizados na frente invasiva dessas células. Uma vez ativada, a MMP-2 é capaz de

degradar diversas moléculas da MEC, o que além de “abrir espaço para as células passarem” também expõe porções dessas moléculas que não estavam disponíveis anteriormente, muitas com atividade de sinalização pró-tumoral. (HIDEAKI, 1998). Portanto, a presença e atividade de MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2 se faz essencial para a progressão do melanoma, contribuindo para os processos de invasão e metástase. (HOFMANN, et al., 2000). Além disso, a MMP-2 ativa cliva moléculas da superfície celular responsáveis pela adesão ao substrato, reduzindo assim o espraiamento dessas células e facilitando o processo de migração, atividade essa que é inibida na presença de TIMP-2. (RAY; STETLER-STEVENSON, 1995).

O resultado esperado após os tratamentos seria a redução da atividade da MMP-2 (pelo menos para o M1), uma vez que Potrich (2014) havia constatado a redução da expressão gênica dessa molécula. Entretanto, se considerarmos todos os passos necessários para a obtenção de moléculas de MMP-2 ativas no ambiente extracelular, possivelmente 96h de tratamento não tenham sido suficientes para que a redução da expressão gênica se refletisse na redução significativa da produção de moléculas ativas de MMP-2. Portanto, essa molécula provavelmente não está relacionada à redução da capacidade migratória de B16-F10 após tratamentos.

Dada a importância da MT1-MMP descrita acima e tendo em vista que os tratamentos com M1 ou M8 reduzem a expressão gênica dessa molécula, futuramente pretendemos averiguar sua atividade após o tratamento das células, uma vez que essa MMP de membrana também apresenta atividade gelatinolítica direta, além de sua capacidade de ativar a MMP-2. Para isso, pretendemos realizar em um ensaio onde as células pré-tratadas seriam plaqueadas sobre uma camada de gelatina conjugada a fluoresceína, a qual quando clivada pelas MMPs apresenta fluorescência. Dessa forma, as células seriam fotografadas ao longo do tempo a fim de monitorar a degradação dessa MEC artificial. Além disso, poderíamos fazer marcações com anticorpos para as diferentes MMPs afim de detectar qual ou quais delas seriam moduladas pelos tratamentos.

6.4. *FORMAÇÃO DE COLÔNIAS*

6.4.1. TANTO M1 QUANTO M8 REDUZEM A CAPACIDADE DAS CÉLULAS B16-F10 DE FORMAR COLÔNIAS EM MATRIZ DE ALGINATO

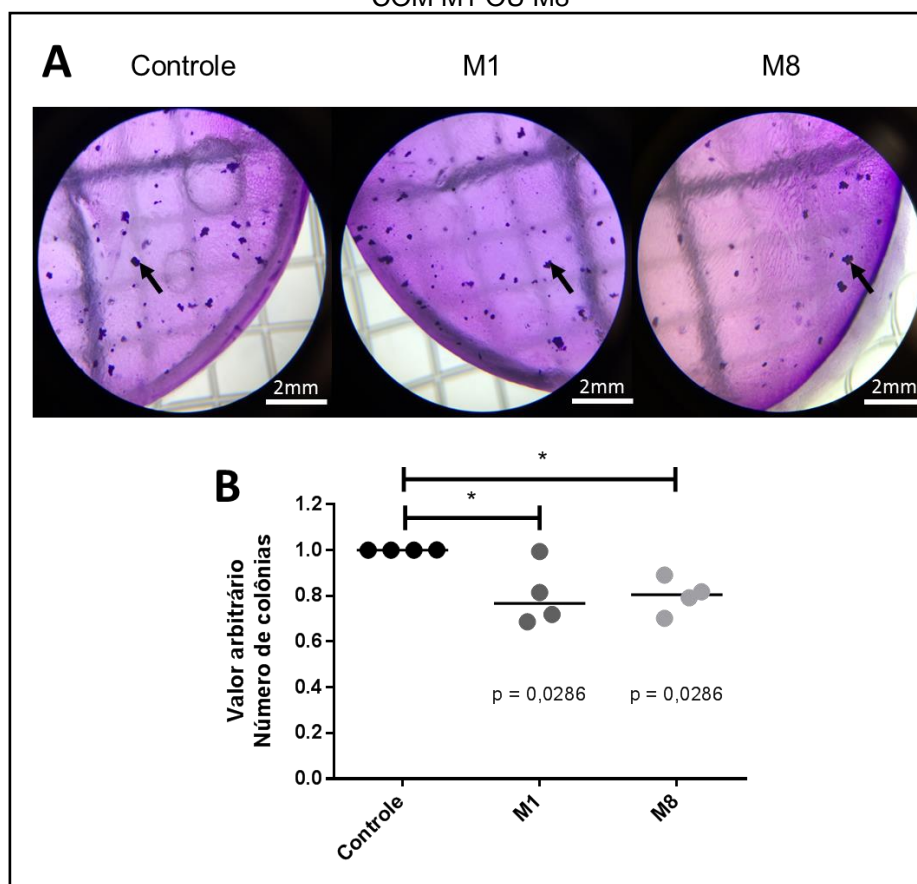
Todos os resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, o que inclui o presente trabalho, bem como os anteriores, nos levam a crer que os tratamentos com M1 ou M8 (mesmo que de maneiras diferentes) diretamente sobre células de melanoma B16-F10 são capazes de modificar o fenótipo altamente agressivo dessas células, tornando-as menos capazes de gerar tumores, sejam primários ou secundários. Dessa forma, buscamos realizar um ensaio de formação de colônias inseridas em uma matriz 3D de alginato a fim de verificar se após o tratamento das células por 96 horas com M1 ou M8 sua capacidade de gerar colônias a partir de si próprias seria realmente alterada.

Primeiramente, realizamos testes a fim de verificar o melhor número de células a ser plaqueado para que ao final do tempo de incubação na matriz de alginato obtivéssemos colônias homogêneas e individualizadas o suficiente para que pudéssemos quantificá-las (dados não mostrados). Após a padronização, partiu-se do mesmo número (2500) de células pré-tratadas para cada grupo experimental. Após 6 dias pudemos observar que tanto M1 quanto M8 foram capazes de reduzir a quantidade de colônias geradas a partir de B16-F10 (Figura 13).

Segundo a literatura, existe boa correlação entre ensaios de formação de colônias por células tumorais tratadas com agentes citotóxicos e os resultados observados *in vivo* usando os mesmos agentes. (MEYSKENS; SALMON, 1979). O ensaio mais comum para formação de colônias é o de soft-ágar, onde as células são mantidas em suspensão separadas umas das outras por um gel a base de ágar. O ensaio realizado no presente trabalho usa uma abordagem muito semelhante, com a diferença de que a matriz usada no nosso caso foi um gel de alginato.

A capacidade de se agregar homotipicamente através das glicoproteínas e crescer em colônias de forma independente de ancoragem a um substrato é uma característica importante para células cancerígenas, uma vez que reflete sua capacidade de proliferar e formar novos tumores em locais distantes da sua origem. (LOTAN; RAZ, 1983). Além disso, as células não tumorais do organismo hospedeiro tem influência importante na formação de colônias de melanoma. (MEYSKENS, 1980). Isso sugere, portanto, que a redução do crescimento dos tumores sólidos, bem como a menor formação de metástases pulmonares observadas *in vivo* na presença dos tratamentos deve-se também à redução direta da capacidade dessas células em formar colônias a partir de si. É interessante notar ainda que, aparentemente, o tamanho médio das colônias geradas a partir de células tratadas com M1 ou M8 é menor do que no controle. Dessa forma, futuramente pretendemos analisar se essa diferença de tamanho, em adição à diferença de quantidade de colônias, é estatisticamente significativa.

FIGURA 13 – FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DE B16-F10 EM MATRIZ DE ALGINATO APÓS TRATAMENTO COM M1 OU M8



As células B16-F10 foram plaqueadas em placas de 6 poços e tratadas com 20% v/v de M1 ou M8 por 96h e então desaderidas com rodinho e contadas. Foram feitas suspensões contendo 2500 células em 0,5 mL de DMEM com 10% de SFB e 10% de tampão firmador, as quais foram adicionadas às placas de *AlgiMatrix*®. As placas foram centrifugadas a 100 g por 5 minutos para auxiliar a sedimentação das células na matriz de alginato. Foram adicionados mais 0,5 mL de DMEM com 10% de SFB. As placas foram incubadas por 6 dias a 37°C e 5% de CO₂ para a formação das colônias, com uma troca de todo o meio no terceiro dia. As células foram então coradas com cristal violeta para a visualização das colônias formadas. A) As matrizes de alginato contendo as colônias foram colocadas em placas de petri com fundo quadriculado (2 mm), divididas em 4 quadrantes e fotografadas sob estereomicroscópio. B) As colônias com área maior que 0,009 mm² foram contadas usando o programa ImageJ. Os pontos do gráfico representam a soma do número de colônias contidas nos 4 quadrantes de cada amostra comparada ao seu respectivo controle. Foram realizados 4 experimentos independentes. As barras representam a mediana dentre os pontos. Teste Mann Whitney.

FONTE: O autor (2016).

Os trabalhos realizados pelo nosso grupo até o momento indicam que o efeito final de redução do crescimento tumoral seja o resultado da soma de vários fatores, como: alteração nas moléculas da MEC, que por muitos motivos levariam à redução do crescimento dos tumores sólidos, bem como dos nódulos pulmonares e também da capacidade de invasão das células de melanoma; redução da capacidade angiogênica, acarretando menor nutrição para o crescimento das células tumorais; melhoria da capacidade de resposta do sistema imunológico frente às células de melanoma; alteração em moléculas de adesão nas células cancerosas, o que poderia dificultar a adesão homo

e heterotípica entre as células, atrapalhando assim seu crescimento, infiltração e instalação nos pulmões; e, finalmente, redução da capacidade das células de melanoma em gerar colônias, afetando sua capacidade tumorigênica diretamente.

Em suma, e de acordo com o que foi discutido ao longo do texto, há diversas moléculas-chave que são importantes para o processo de progressão do melanoma, o que inclui moléculas de adesão (célula-célula e célula-MEC), proteínas envolvidas em vias de sinalização intracelulares, bem como enzimas de degradação da matriz. O presente trabalho teve como objetivo verificar se os tratamentos *in vitro* de células de melanoma B16-F10 com os complexos naturais altamente diluídos M1 ou M8 por 96 horas seriam capazes de causar alterações no padrão de expressão/ativação dessas moléculas. Os resultados obtidos na Parte I desse trabalho (resumidos na Tabela 2) nos permitiram identificar moléculas de adesão que são alteradas em B16-F10 como resultados dos tratamentos com M1 ou M8, bem como aquelas que não o são, justificando em parte os resultados obtidos nos trabalhos anteriores, em especial a redução da capacidade migratória dessas células observada por Potrich (2014). Com relação às vias de sinalização intracelulares, ainda não pudemos identificar qual ou quais vias estão sendo moduladas pelos tratamentos a fim de gerar os resultados observados. Pudemos ainda verificar que a redução do crescimento tumoral provavelmente se deve também à redução da capacidade de B16-F10 em formar colônias.

TABELA 2 - RESUMO DOS RESULTADOS DA PARTE I

	M1	M8
Marcação para CD44	—	↓
Marcação para N-caderina	↓	↓
Marcação para PGCS4/NG2	—	—
Marcação para CD54/ICAM-1	↑	—
Marcação para LAMP-1	—	—
Ativação de AKT	—	—
Marcação para β -catenina	—	—
Atividade de MMP-2	—	—
Capacidade de formação de colônias	↓	↓

Os traços pretos representam resultados que não foram estatisticamente diferentes quando comparados ao controle. As setas azuis representam diminuição e a vermelha aumento quando comparado ao controle.
FONTE: O autor (2016).

PARTE II

Os resultados desse trabalho, em conjunto com os obtidos previamente por Potrich em 2014, demonstraram efeitos interessantes resultantes dos tratamentos com M1 e M8 diretamente sobre as células de melanoma. No entanto, o modelo de cultivo *in vitro* de um único tipo celular (no nosso caso células de melanoma) algumas vezes mostra-se muito limitado para explicar de que forma os tratamentos são capazes de reduzir o crescimento tumoral e formação de metástases *in vivo*. Dessa forma, julgamos necessário tornar nosso modelo de estudos *in vitro* mais complexo, oferecendo às células tumorais a possibilidade de contato com outro tipo celular bastante presente no microambiente tumoral, como os fibroblastos por exemplo. Portanto, essa parte do trabalho teve como objetivo verificar os efeitos do tratamento *in vitro* com M1 ou M8 sobre eventos da comunicação entre células de melanoma e fibroblastos, especificamente sobre a produção de moléculas de MEC, bem como enzimas que a remodelam e também moléculas de adesão célula-célula e célula-MEC.

Dentre os muitos tipos celulares presentes no microambiente tumoral elegemos os fibroblastos porque essas células são capazes de influenciar em praticamente todos os processos que levam à progressão do melanoma, como proliferação, capacidade migratória e invasiva, resistência à morte celular, angiogênese, etc. (HANAHA; COUSSENS, 2012). Para a realização dos ensaios de cocultura escolhemos trabalhar com fibroblastos de linhagem estabelecida devido à facilidade de manipulação e devido ao fato de as células de melanoma também serem uma linhagem. A linhagem de fibroblastos Balb/3T3 foi estabelecida a partir de embriões de camundongos Balb/C em 1968 por Aaronson e Todaro e apresenta morfologia fibroblástica com aparência granular. Essas células crescem de forma estável ao longo dos subcultivos, apresentam inibição por contato – característica semelhante à de células normais – e não são tumorigênicas. (AARONSON; TODARO, 1968).

Essa linhagem de fibroblastos é bastante utilizada em trabalhos científicos para estudos com diversas finalidades, como diferenciação celular e cicatrização (NEGMADJANOV et al., 2015), como linhagem de fibroblastos murinos normais em estudos de toxicidade contra câncer (NAMVAR et al., 2015), engenharia de tecidos (USLU et al., 2015), etc. Além disso, e interessante para o nosso trabalho, são utilizados em vários estudos de sinalização intercelular com células cancerosas, seja estudando seu metabolismo individual (SHIM et al., 2015) ou seus efeitos sobre outras células (SAITO et

al., 2010; BANSAL et al., 2012; BARKER et al., 2013), uma vez que são capazes de diferenciarem-se em CAFs quando estimuladas por células tumorais.

Dessa forma, anteriormente à realização dos ensaios de cocultura, julgamos importante verificar se o tratamento *in vitro* com M1 ou M8 alteraria comportamentos característicos dos fibroblastos, como proliferação e viabilidade, uma vez que esses processos devem ser mantidos estáveis em cultura.

6.5. CARACTERÍSTICAS DE INTEGRIDADE CELULAR

6.5.1. O TRATAMENTO *IN VITRO* COM M1 OU M8 NÃO ALTERA O PADRÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DE FIBROBLASTOS MURINOS Balb/3T3

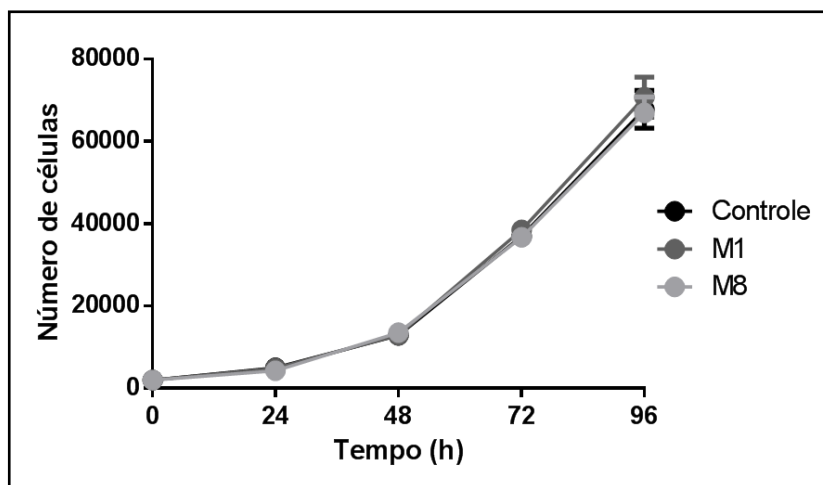
A fim de verificar se o tratamento *in vitro* de fibroblastos murinos Balb/3T3 com M1 ou M8 alteraria o padrão de proliferação dessas células, as mesmas foram tratadas por 96 horas e posteriormente coradas com cristal violeta. Uma vez que o presente trabalho busca compreender os resultados encontrados por Potrich (2014) após tratamento *in vitro* das células de melanoma por 96 horas, adotamos esse mesmo tempo de tratamento também para os experimentos de cocultura.

O ensaio colorimétrico de cristal violeta é bastante usado para determinar a proliferação celular e baseia-se na coloração do DNA. Portanto, a intensidade da coloração da monocamada é proporcional à quantidade de células. (BONNEKOH et al., 1989; VEGA-AVILA; PUGSLEY, 2011). A curva de crescimento do controle foi comparada às dos grupos tratados com M1 ou M8. Os dados obtidos mostraram que os tratamentos com M1 ou M8 não alteraram o padrão de proliferação celular nas condições estudadas (Figura 14).

6.5.2. O TRATAMENTO *IN VITRO* COM M1 OU M8 NÃO ALTERA A VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS MURINOS Balb/3T3

Com o propósito de verificar se o tratamento *in vitro* de fibroblastos murinos Balb/3T3 com M1 ou M8 alteraria a viabilidade dessas células, as mesmas foram tratadas por 96 horas e posteriormente submetidas à marcação com anexina V e 7AAD.

FIGURA 14 – CURVA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DE Balb/3T3 APÓS TRATAMENTO COM M1 OU M8



As células foram tratadas com 20% v/v de M1 ou M8 por 24, 48, 72 ou 96 horas e então fixadas e coradas com cristal violeta. Os valores de absorbância obtidos foram comparados a uma curva padrão da coloração para diferentes números de células da mesma linhagem a fim de estimar o número de células presentes em cada grupo experimental após o término dos tratamentos. Foram realizados dois experimentos independentes em octuplicata. Os dados apresentados representam a média \pm erro padrão da média. Teste Mann Whitney.

FONTE: O autor (2016).

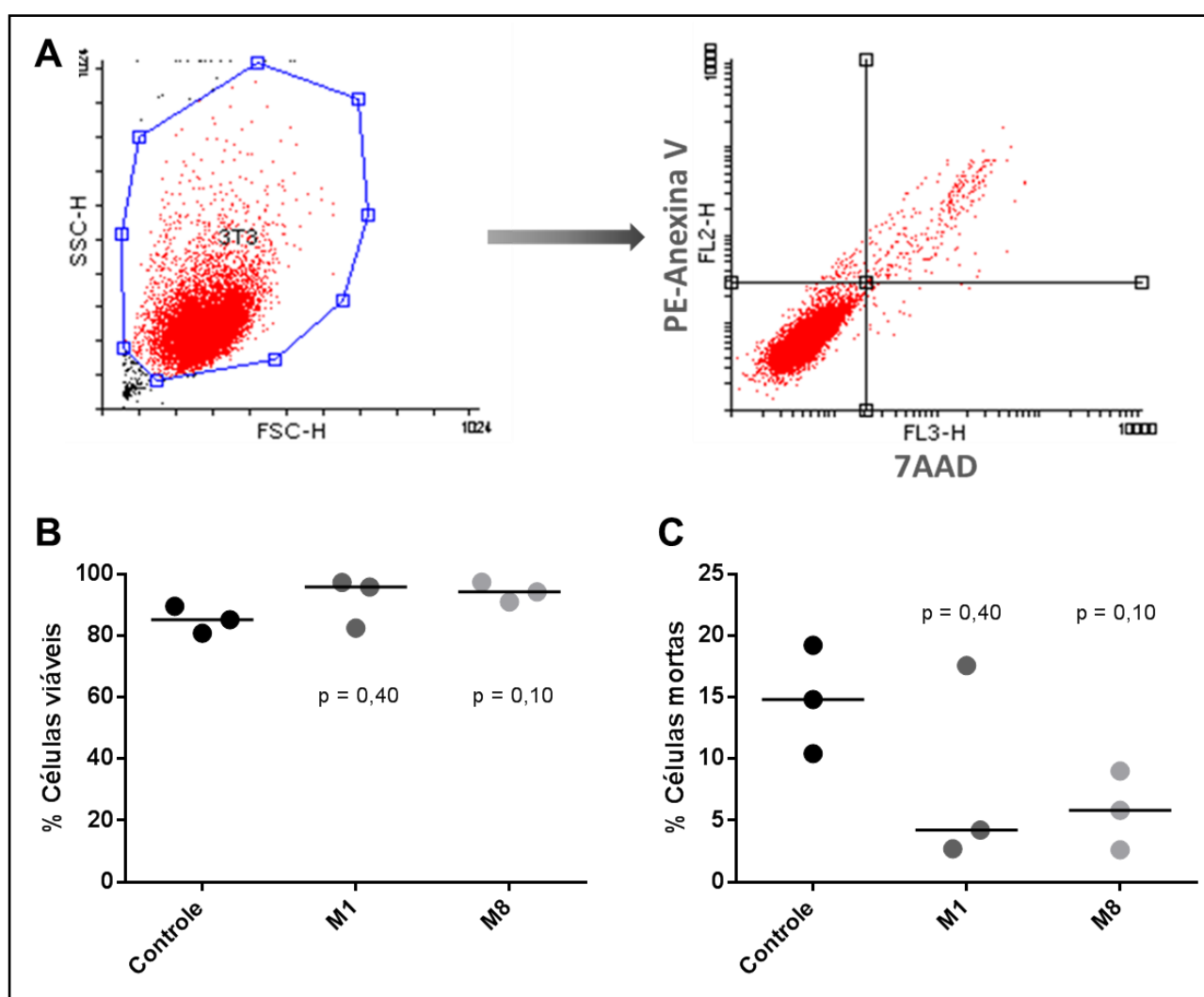
Vale salientar que durante o processo de morte celular por apoptose, a translocação de fosfatidilserina (PS) da camada interna para a externa da membrana plasmática é um dos primeiros eventos a ocorrer. (KAY; GRINSTEIN, 2011). A anexina V é uma proteína com alta afinidade pela PS, no entanto não é capaz de atravessar a membrana plasmática, assim é usada nesse tipo de ensaio para marcar células no início da apoptose, isso é, que externalizaram a PS. Por outro lado, células já mortas ou em necrose apresentam danos na membrana e, portanto, permitem a passagem do corante 7AAD pela membrana plasmática.

No presente ensaio consideramos as células negativas para ambos os marcadores como viáveis e as positivas para cada um, ou para ambos, como mortas (ou em processo de morte celular). Os dados obtidos mostraram que os tratamentos com M1 ou M8 não alteram a viabilidade celular após 96 horas quando comparados ao controle (Figuras 15 B e C).

Os dados obtidos nos permitiram concluir que os tratamentos com M1 ou M8 não alteram comportamentos característicos dos fibroblastos murinos, vide proliferação e viabilidade (Figuras 14 e 15). Portanto, julgamos seguro prosseguir para os ensaios de cocultura a fim de testar os efeitos dos tratamentos sobre eventos da comunicação entre células de melanoma e fibroblastos.

Nós escolhemos trabalhar com cocultura de contato entre as células B16-F10 e Balb/3T3, uma vez que esse modelo reflete uma situação de comunicação entre células de melanoma e fibroblastos em um ambiente tumoral. Para isso, as células foram plaqueadas conjuntamente em recipientes de cultivo adequados para cada experimento e após 6-8 horas foram tratadas com M1 ou M8, como descrito no tópico de Materiais e Métodos. Portanto, o contato físico entre os dois tipos celulares passou a ocorrer à medida que elas se proliferavam em cultura ao longo das 96 horas de tratamento.

FIGURA 15 - DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE/MORTE CELULAR DE Balb/3T3 APÓS TRATAMENTO COM M1 OU M8



As células foram tratadas com 20% v/v de M1 ou M8 por 96 horas e então submetidas à marcação com anexina V e 7AAD. A) seleção da população de células correspondente aos fibroblastos murinos Balb/3T3 e determinação dos quadrantes para marcação com PE-anexina V e 7AAD. B) Porcentagem de células consideradas viáveis, correspondente ao quadrante inferior esquerdo de A (negativo para ambos marcadores). C) porcentagem de células consideradas mortas, correspondente à soma dos quadrantes superior esquerdo, superior direito e inferior direito de A (positivo para um ou ambos marcadores). Foram realizados três experimentos independentes. Os pontos representam a média de cada experimento e as barras representam a mediana entre os pontos. Teste Mann Whitney. FONTE: O autor (2016).

6.6. MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO PARA CAFs

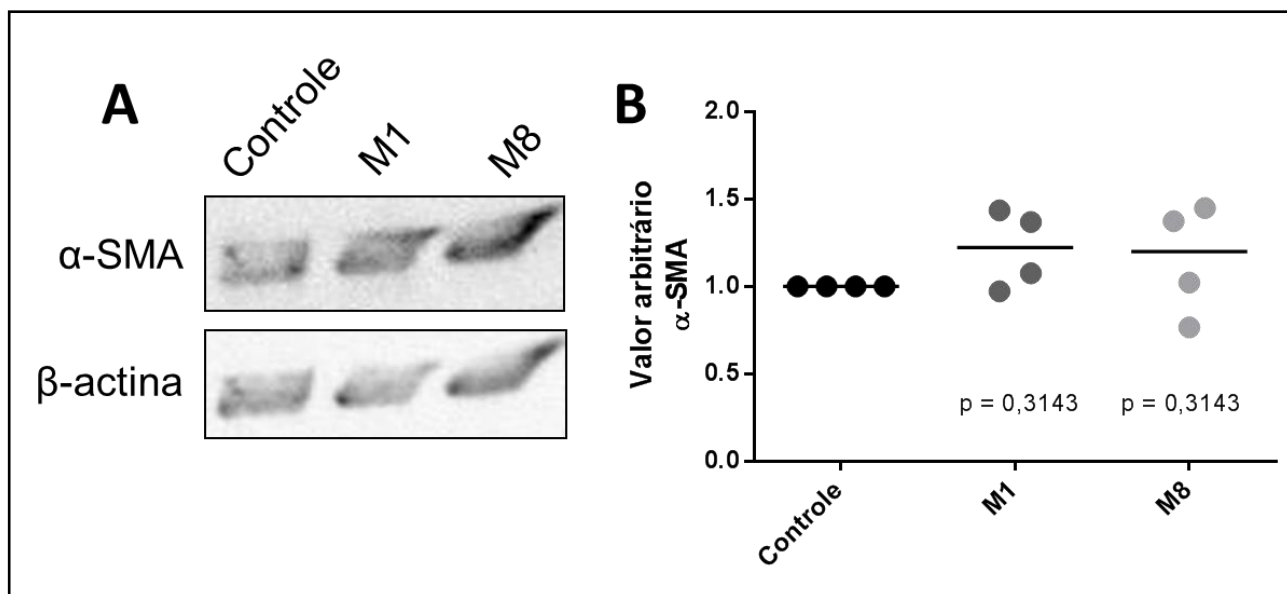
6.6.1. OS TRATAMENTOS COM M1 OU M8 NÃO ALTERAM A MARCAÇÃO PARA α -SMA NO EXTRATO PROTEICO DA COCULTURA ENTRE B16-F10 E Balb/3T3

Os CAFs são células com características distintas das encontradas em fibroblastos normais, uma vez que sofrem efeito da presença das células tumorais. Esses CAFs podem adquirir propriedades de miofibroblastos, os quais expressam actina (α -SMA, do inglês *α smooth muscle actin*) característica de células contráteis, apresentam capacidade de remodelar a MEC, construindo um “tecido tumoral”, além de secretarem moléculas sinalizadoras. Essas particularidades auxiliam nos processos de crescimento tumoral, angiogênese, inflamação, metástase e resistência a drogas. (ZHOU et al., 2015). Sabendo disso, o objetivo dessa parte do trabalho foi simular um microambiente tumoral que contivesse células de melanoma em contato com os CAFs. Portanto, buscamos quantificar a marcação para α -SMA com o objetivo de saber se os tratamentos com M1 ou M8 seriam capazes de alterar o processo de diferenciação dos CAFs. Não foi observada diferença na intensidade da marcação entre os grupos (Figura 16), o que sugere que os complexos não interferem nesse processo de diferenciação.

Bem como os encontrados no restante do organismo, os fibroblastos associados ao tumor podem apresentar-se de maneira bastante heterogênea, o que reflete as várias origens possíveis para essas células, sendo difícil encontrar marcadores moleculares que estejam presentes em todos dos CAFs de um mesmo tumor. Moléculas como o receptor α de PDGF e FSP-1 (do inglês *fibroblast specific protein 1*) são bastante comuns nessas células, porém não em todas. Entretanto, para modelo de melanoma murino, a expressão de α -SMA parece estar presente em todas as subpopulações de CAFs. (ANDERBERG; PIETRAS, 2009).

O resultado obtido aqui nos permitiu inferir que provavelmente os tratamentos com M1 ou M8 não afetam a diferenciação dos fibroblastos em CAFs nas condições testadas, portanto resolvemos investigar se seriam capazes então de interferir na atividade dessas células em conjunto com as células de melanoma.

FIGURA 16 – MARCAÇÃO PARA α -SMA NA COCULTURA ENTRE B16-F10 E Balb/3T3 APÓS TRATAMENTO COM M1 OU M8



As células foram tratadas com 20% v/v de M1 ou M8 por 96 horas e então as proteínas celulares totais foram extraídas e separadas eletroforéticamente, transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a imunomarcações com anticorpos específicos contra α -SMA ou β -actina. A) A revelação das marcações foi feita por quimioluminescência e as bandas quantificadas usando o programa ImageJ. B) Primeiramente, a intensidade das marcações para α -SMA foi normalizada pela intensidade de marcação para β -actina. Posteriormente, os valores obtidos dessa razão para as amostras tratadas com M1 ou M8 foram comparadas aos do controle. Os pontos representam a razão α -SMA/ β -actina comparada ao controle. As barras representam a mediana entre os pontos. Foram feitos 4 experimentos independentes. Teste Mann-Whitney.

FONTE: O autor (2016).

6.7. DETECÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO E MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE CELULAR

6.7.1. O TRATAMENTO COM M8 INIBE A PRODUÇÃO/SECREÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO PELAS CÉLULAS DA COCULTURA ENTRE B16-F10 E Balb/3T3

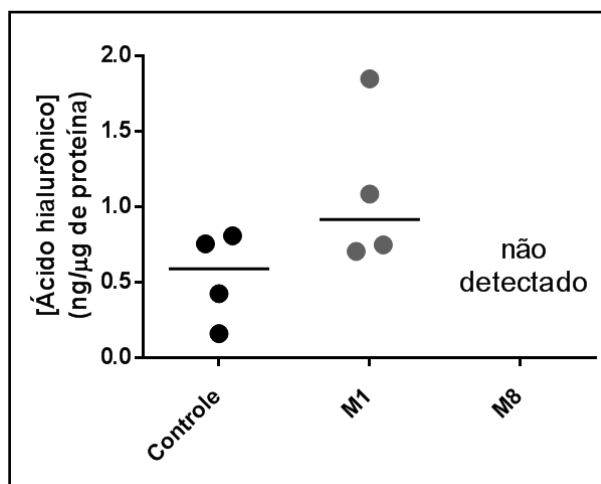
O glicosaminoglicano ácido hialurônico (AH) é um importante componente da MEC. As células de melanoma produzem pequenas quantidades de AH, enquanto que os fibroblastos são a principal fonte dessa molécula no estroma, a qual é produzida principalmente pela enzima hialuronam sintase 2 (HAS2). Proteínas secretadas por células do melanoma, como PDGF, por exemplo, podem estimular a síntese de AH pelos fibroblastos. O PDGF sinaliza através de PDGFR- α para o aumento da expressão de HAS2 via PI3K, estimulando a síntese e secreção de AH, o qual por sua vez, atua nas células cancerosas através de CD44, como discutido anteriormente. (WILLENBERG et al., 2012). Moléculas de AH podem ainda ser degradadas em fragmentos de menor peso

molecular por hialuronidases (secretadas principalmente por fibroblastos em condições normais, mas em maior quantidade pelas células tumorais). Esses fragmentos tornam-se sinalizadores extracelulares solúveis e são capazes de ligar em TLR4 e estimularem sinalização intracelular, ativando o fator de transcrição NFκB e culminando na indução da produção de IL-8 e MMP-2 em células de melanoma, o que contribui para o crescimento e progressão do tumor. (VOELCKER et al., 2007).

Sabendo que os tratamentos com M1 ou M8 interferem em vários pontos da via descrita acima, modulando a produção de várias das moléculas citadas (AH, hialuronidases 1 e 2, CD44, NFκB e MMP-2) no contexto do cultivo de células de melanoma isoladas (POTRICH, 2014), suspeitamos que seus mecanismos de ação pudessem envolver esse processo de sinalização via AH. Para responder essa pergunta, foi realizada a quantificação do AH produzido e liberado no sobrenadante pelas células da cocultura entre B16-F10 e Balb/3T3 utilizando sonda específica para o reconhecimento dessa molécula. (MARTINS et al., 2003). Após o tratamento com M8 observamos que não houve detecção de AH no sobrenadante (Figura 17), indicando importante redução da sua produção, o que corrobora com o dado obtido por Potrich (2014) em B16-F10. O resultado esperado era que M1 também reduzisse a síntese de AH pela cocultura, uma vez que *in vivo* foi capaz de reduzir a marcação dessa molécula nos tumores subcutâneos e pulmonares (FERRARI DE ANDRADE, 2014). Entretanto, o tratamento com M1 não causou alteração na quantidade de AH produzido pelas células da cocultura, indicando que a menor presença dessa molécula observada nos tumores provavelmente não é resultante da interferência desse complexo na atividade dos fibroblastos.

Ao contrário do que se especulava com base em estudos de outros tipos de câncer, o AH em células de melanoma não tem função de estimular a proliferação celular (tanto *in vitro* quanto *in vivo*), mas sim é capaz de promover a formação de metástases. Uma única injeção de peptídeo bloqueador de AH é capaz de reduzir significativamente a formação de metástases pulmonares derivadas de B16-F10, bem como aumentar o tempo de sobrevivência dos animais portadores dos tumores. (MUMMERT et al., 2003). Dessa forma, a inibição da produção de AH provocada pelo M8 na cocultura poderia ser uma razão para termos visto a redução da formação de metástases *in vivo* resultante do tratamento com esse complexo.

FIGURA 17 - PRODUÇÃO/LIBERAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO PELAS CÉLULAS DA COCULTURA ENTRE B16-F10 E Balb/3T3 APÓS TRATAMENTO COM M1 OU M8



As células da cocultura entre B16-F10 e Balb/3T3T foram tratadas com 20% v/v de M1 ou M8 por 96h. A concentração de ácido hialurônico produzido e liberado no sobrenadante foi estimada utilizando proteína de ligação ao ácido hialurônico biotinilada e então normalizada pela concentração de proteínas extraídas das células das mesmas amostras. Foram realizados 2 experimentos independentes. Os pontos representam a concentração de ácido hialurônico no sobrenadante dividido pela concentração de proteínas celulares de cada amostra e as barras representam a mediana entre os pontos.

FONTE: O autor (2016).

Além da produção do próprio AH, a atuação de hialuronidases é de fundamental importância para a clivagem desse glicosaminoglicano, liberando seus fragmentos ativos. Potrich (2014) observou em seu trabalho que os tratamentos com M1 ou M8 são capazes de reduzir a expressão gênica das hialuronidases 1 e 2 pela metade nas células de melanoma. Portanto, futuramente seria interessante avaliar a atividade dessas enzimas no sobrenadante da cocultura utilizando ensaio de zimograma em AH por SDS-PAGE, o qual se assemelha muito ao zimograma em gelatina descrito anteriormente, com a diferença de que o gel contém AH e é corado com Alcian blue, um corante para carboidratos, revelando, portanto, as bandas onde ocorre a degradação do AH devido à ação de hialuronidases. (MIO; STERN, 2000).

A indução da síntese de AH pelos CAFs é em parte estimulada pela produção de EMMPRIN (CD147) pelas células de melanoma. (QUINN et al., 2013). E antes mesmo disso o EMMPRIN é ainda responsável pela própria transformação dos fibroblastos em CAFs e também pela indução da EMT nas células tumorais. (XU et al., 2013). Portanto, futuramente pretende-se verificar se os tratamentos com M1 ou M8 alteram a expressão dessa molécula nas células de melanoma.

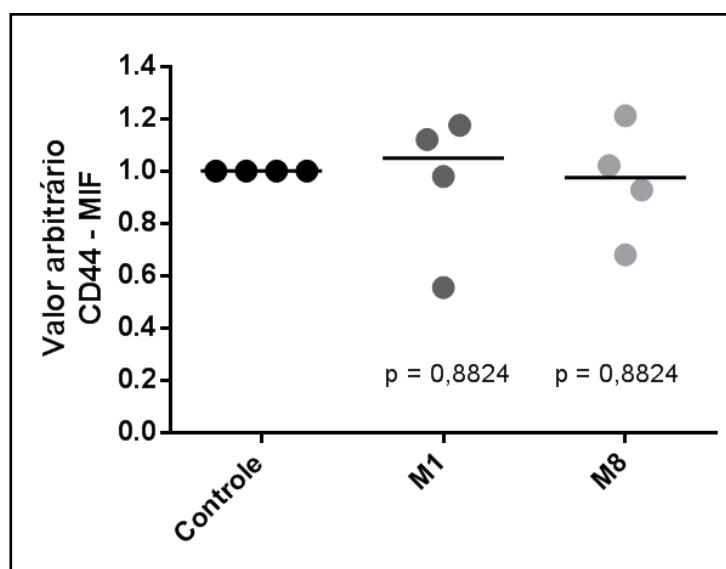
A MEC rica em AH produzida no microambiente tumoral favorece ainda o recrutamento de células inflamatórias e progenitores endoteliais, acelerando o processo de angiogênese e consequentemente a progressão do tumor. (ITANO et al., 2008). Essa

é mais uma evidência de que provavelmente a via de síntese de AH seja alterada pelos nossos tratamentos, uma vez que a angiogênese tumoral *in vivo* também foi reduzida.

6.7.2. OS TRATAMENTOS COM M1 OU M8 NÃO ALTERAM A MARCAÇÃO DAS CÉLULAS DA COCULTURA ENTRE B16-F10 E Balb/3T3 PARA CD44

Além do que já foi discutido anteriormente sobre a importância do CD44 expresso por células de melanoma, essa molécula é também importante no desenvolvimento da doença quando presente nos CAFs. Essas células expressam CD44 em grande quantidade, especialmente em regiões de hipóxia e hiponutrição no interior do tumor, o que está relacionado à manutenção do tumor e sua resistência a multidroga. (KINUGASA et al., 2014). Sabendo que o M8 inibiu a síntese de AH pelas células da cocultura, gostaríamos de saber se esse resultado seria acompanhado da redução da presença de CD44 no microambiente tumoral artificial. Para responder essa pergunta, foi realizada a análise para a marcação de CD44 em todas as células da cocultura entre B16-F10 e Balb/3T3 por citometria de fluxo. Curiosamente, não foram observadas alterações na marcação após tratamento com M1 ou M8 (Figura 18).

FIGURA 18 - MARCAÇÃO DAS CÉLULAS DA COCULTURA ENTRE B16-F10 E Balb/3T3 PARA CD44 APÓS TRATAMENTO COM M1 OU M8



Todas as células foram desaderidas e marcadas com anticorpo contra CD44. Nenhum dos tratamentos alterou a marcação das células para CD44 quando analisadas por citometria de fluxo. Foram realizados 4 experimentos independentes. A intensidade de fluorescência de cada amostra foi comparada ao seu respectivo controle de cada experimento. Os pontos representam a média de para cada experimento. As barras representam a mediana de todos os valores para cada grupo. Os dados foram comparados pelo teste Mann Whitney.

FONTE: O autor (2016).

O resultado de marcação de CD44 observado após tratamento com M1 já era esperado, uma vez que *in vivo* a redução da síntese de AH nos tumores também não foi acompanhada pela redução da marcação para CD44 (FERRARI DE ANDRADE, 2014), sugerindo novamente que a sinalização via AH na presença desse complexo se dê através de outro receptor. Com relação ao resultado encontrado após tratamento com M8, nossa hipótese é de que a inibição da síntese de AH promovida nas células da cocultura talvez já seja suficiente para reduzir a formação das metástases pulmonares, não havendo necessidade de modulação também do receptor CD44.

O CD44 expresso por células tronco mesenquimais do estroma tumoral está relacionado à transformação dessas células em CAFs, contribuindo para a expressão de outros marcadores de CAFs, bem como sua capacidade migratória e subsequente suporte para a angiogênese. (SPAETH et al., 2013). O CD44 presente nos CAFs contribui ainda para a migração e agressividade das células tumorais. (SHIM et al., 2010). Entretanto, a redução global de CD44 no microambiente tumoral artificial parece não ser o fator responsável pela redução da angiogênese, crescimento do tumor e formação de metástases, uma vez que a marcação para essa molécula nas células da cocultura não foi alterada após tratamento com M1 ou M8. Porém, vale lembrar que a marcação foi verificada em ambas as células (melanoma e fibroblastos) simultaneamente, portanto, não podemos inferir com certeza que a expressão de CD44 especificamente nos fibroblastos não foi alterada.

6.7.3. O TRATAMENTO COM M8 REDUZ A MARCAÇÃO DAS CÉLULAS DA COCULTURA ENTRE B16-F10 E Balb/3T3 PARA N-CADERINA

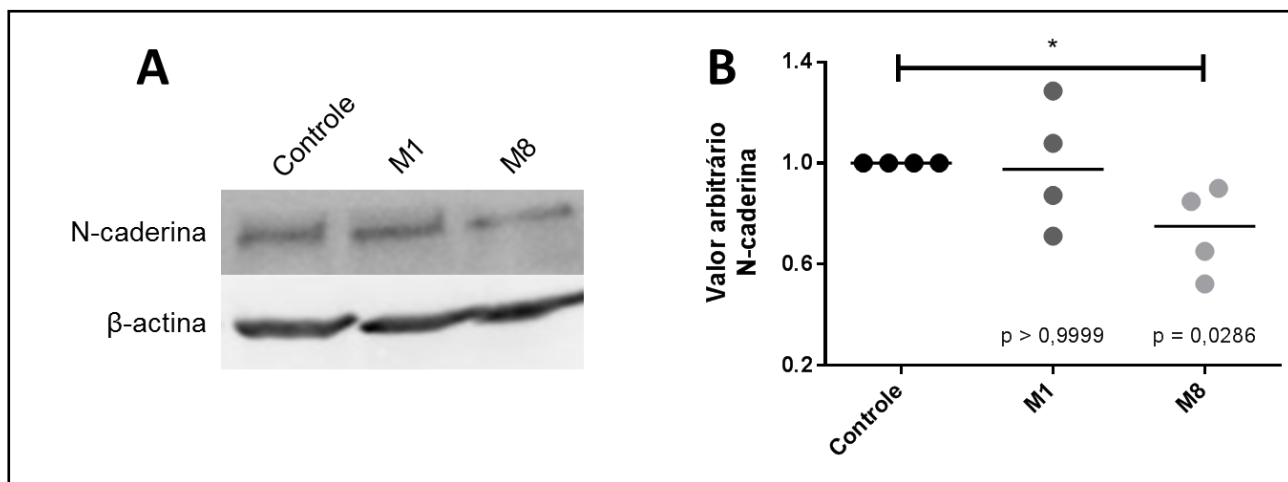
Considerando o papel da N-caderina para a comunicação entre células de melanoma e fibroblastos descrito anteriormente e sabendo que os tratamentos tanto com M1 quanto com M8 reduzem a marcação das células de melanoma para essa molécula, achamos interessante verificar se no contexto da cocultura entre B16-F10 e Balb/3T3 também haveria uma redução global da presença de N-caderina. Para responder essa pergunta, as proteínas totais das células aderentes da cocultura foram extraídas e a marcação para N-caderina foi feita por *western blot*. O tratamento com M8 foi capaz de reduzir significativamente a marcação, enquanto M1 não o fez (Figura 19).

A alternância de caderinas que faz com que as células de melanoma percam a ligação aos queratinócitos e passem a se ligar aos fibroblastos é essencial para o estabelecimento de junções tipo gap com um ou outro tipo celular, o que se dá através

das conexinas e definirá qual célula terá o controle sobre a célula cancerosa. (HSU et al., 2000). Segundo descrevem Li e colaboradores (2003) em uma revisão sobre a interação de células de melanoma com o estroma aparentemente não são apenas as próprias E ou N-caderinas ou outras proteínas envolvidas na sua sinalização intracelular que determinam o comportamento das células de melanoma, mas também as células da vizinhança que fazem contato com a célula cancerosa em decorrência da expressão de uma ou outra molécula. Portanto, se trata de uma questão de “boas ou más influências”. (LI et al., 2003).

Dessa forma, a redução da marcação para N-caderina promovida pelo tratamento com M8 sobre células de melanoma isoladas, bem como na cocultura dessas células com fibroblastos é um resultado muito promissor, uma vez que reduzindo a presença dessa molécula no ambiente tumoral, reduz-se a probabilidade de comunicação entre as células de melanoma e seus “vizinhos maus”, os fibroblastos. Entretanto, para o M1 aparentemente a redução de N-caderina em B16-F10 está mais relacionada à redução da migração do que à interação dessas células com os fibroblastos, uma vez que a marcação dessa molécula só foi alterada pelo tratamento quando aplicado sobre as células de melanoma isoladas.

FIGURA 19 – MARCAÇÃO PARA N-CADERINA NA COCULTURA ENTRE B16-F10 E Balb/3T3 APÓS TRATAMENTO COM M1 OU M8



As células foram tratadas com 20% v/v de M1 ou M8 por 96 horas e então as proteínas celulares totais foram extraídas e separadas eletroforéticamente, transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a imunomarcações com anticorpos específicos contra N-caderina ou β-actina. A revelação das marcações foi feita por quimioluminescência e as bandas quantificadas usando o programa ImageJ. Primeiramente, a intensidade das marcações para N-caderina foi normalizada pela intensidade de marcação para β-actina. Posteriormente, os valores obtidos dessa razão para as amostras tratadas com M1 ou M8 foram comparadas aos do controle. Os pontos representam a razão N-caderina/β-actina comparada ao controle. As barras representam a mediana entre os pontos. Foram feitos 4 experimentos independentes. Teste Mann-Whitney.

FONTE: O autor (2016).

6.8. ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DA MMP-2

Tanto as próprias células tumorais como as células do estroma são capazes de produzir MMPs, sendo que essas últimas podem ser estimuladas a expressar as enzimas devido a fatores solúveis secretados por células tumorais ou mesmo por contato direto célula-célula. (HOFMANN et al., 2000). Portanto, verificamos no contexto da cocultura se a atividade dessas moléculas seria alterada pelos tratamentos.

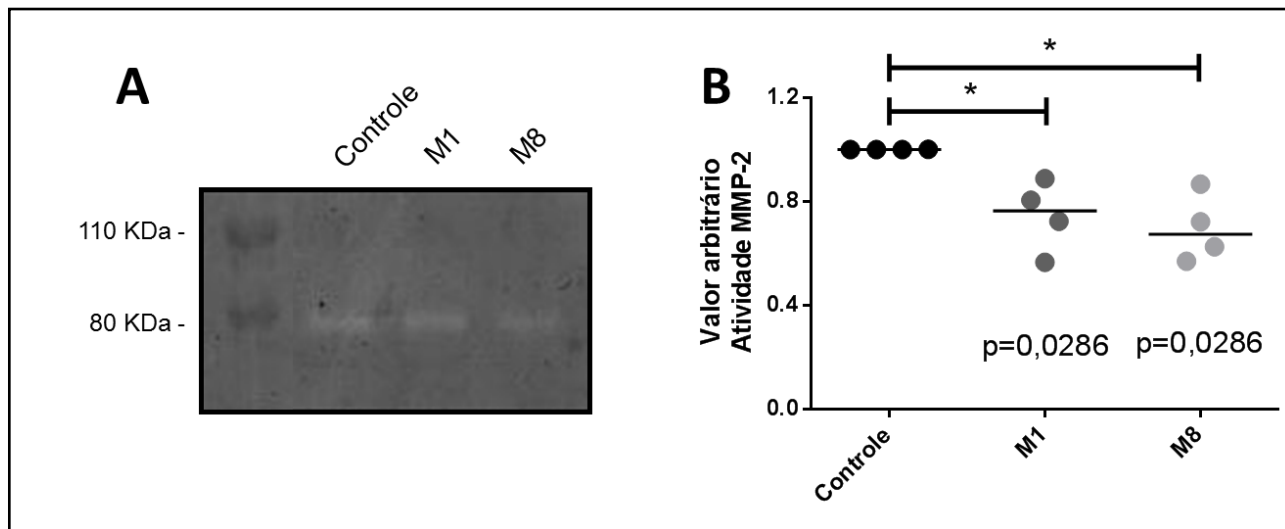
6.8.1. TANTO M1 QUANTO M8 NÃO ALTERAM A ATIVIDADE DA MMP-2 LIBERADA NO SOBRENADANTE DA COCULTURA DE B16-F10 E Balb/3T3 APÓS TRATAMENTO

A via de estimulação da síntese de AH pelos CAFs, descrita no tópico de quantificação de AH, é responsável por alterar morfologicamente essas células, as quais passam a apresentar protrusões de membrana características de células migratórias e a expressar MMPs em maior quantidade, favorecendo sua capacidade invasiva e consequentemente também a das células tumorais. (PASONEN-SEPPANEN et al., 2012). Considerando nossa hipótese de que o mecanismo de ação do complexo M8 atua modulando esse processo de sinalização intercelular mediada pelo AH, julgamos interessante averiguar se isso se refletiria na alteração da atividade das MMPs liberadas no sobrenadante da cocultura após tratamento. Para isso utilizamos a mesma metodologia usada no estudo da atividade de MMPs em B16-F10, ou seja, o zimograma em gelatina por SDS-PAGE do sobrenadante das coculturas. Da mesma forma que para as culturas de melanoma isoladas, nos ensaios de cocultura também só foi possível observar atividade da MMP-2, o que se deve, possivelmente à origem da gelatina utilizada. Pudemos observar que tanto M1 quanto M8 foram capazes de reduzir significativamente a atividade da MMP-2 liberada no sobrenadante da cocultura (Figura 20).

Esse resultado sugere que os tratamentos com M1 ou M8 (mesmo que se valendo de receptores diferentes para o AH) modificam a sinalização via AH, reduzindo assim o estímulo à produção de MMP-2. A MMP-2 foi descrita como sendo a principal enzima gelatinolítica presente em tumores de melanoma e, interessante, sua maior atividade localiza-se nas regiões de mais contato entre as células tumorais e o estroma (KURCHAT et al., 2002), que são as bordas do tumor, onde se dá sua frente invasiva. Curiosamente, isso só se observa em tumores subcutâneos/primários. Em nódulos

gerados após metástase a MMP-2 não é detectada, sugerindo que a expressão dessa molécula é dependente da interação entre células cancerosas e o microambiente ao seu redor. (HOFMANN et al., 2005). Portanto, quando pensamos no tumor de origem tal redução na atividade dessa molécula é fundamental, pois dificulta a degradação da MEC e, consequentemente, a evasão das células de melanoma.

FIGURA 20 – ATIVIDADE DA MMP-2 SECRETADA PELA COCULTURA DE B16-F10 E Balb/3T3 APÓS TRATAMENTO COM M1 OU M8



As células foram tratadas com 20% v/v de M1 ou M8 por 96 horas em placas de 24 poços. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por 300 μ L de DMEM sem SFB e incubado na presença das células B16-F10 pré-tratadas por mais 24h para que secretassem as MMPs no sobrenadante, o qual foi então coletado e misturado com tampão de amostra não-redutor. A) As proteínas desse sobrenadante foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% contendo 1 mg/mL de gelatina. Os géis foram incubados em tampão ótimo para o funcionamento de MMPs por 72h e posteriormente corados com Coomassie para revelação das bandas onde a gelatina havia sido degradada pela ação da gelatinase MMP-2. A intensidade das bandas foi quantificada usando o software ImageJ. Para normalização do resultado as células aderidas às placas foram fixadas e coradas com cristal violeta a fim de estimar o número de células de cada amostra. B) Portanto, a intensidade da banda do gel foi primeiramente normalizada pela absorbância do cristal violeta da sua respectiva amostra e, posteriormente, esse valor de cada amostra foi comparado ao seu respectivo controle de cada experimento. Foram realizados 4 experimentos independentes. Os pontos representam a intensidade das bandas já normalizadas pelo cristal violeta e comparada ao controle. As barras representam a mediana dentre os pontos. Teste Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

FONTE: O autor (2016).

Ao longo dos últimos anos tem-se iniciado um processo de revisitação aos conceitos que circundam os CAFs. Como citado anteriormente, essa população de células do estroma tumoral é bastante heterogênea, compreendendo na verdade várias subpopulações, cada uma com características funcionais diferentes. Uma revisão feita recentemente sobre o assunto sugeriu que passemos a usar o termo polarização para esse tipo celular. Esse termo já é utilizado para as populações de células do sistema imunológico e se refere a populações do mesmo tipo celular, mas que apresentam funções opostas. Por exemplo, para macrófagos associados ao tumor (TAMs), assume-se

que existe todo um espectro de subpopulações diferentes, mas que grosseiramente podem ser divididas em dois tipos: M1 e M2. Os primeiros assumem características supressoras de tumor, enquanto os últimos promovem o crescimento e progressão do tumor. Seguindo essa linha de raciocínio, o autor desse trabalho sugere que passemos a classificar os CAFs em duas categorias: os do tipo I ainda não são muito bem compreendidos com relação aos marcadores moleculares que os definem, mas possuem ação inibitória sobre o crescimento do tumor; já os do tipo II são os mais estudados, com marcadores mais definidos (como FSP-1, α -SMA, PDGFR β , vimentina, MMPs, dentre outros) e função claramente pró-tumoral e metastática. (AUGSTEN, 2014).

Considerando o exposto acima, seria interessante investigarmos futuramente outras moléculas que possam estar sendo moduladas por decorrência dos tratamentos com M1 ou M8 no modelo de cocultura de melanoma com fibroblastos na tentativa de descobrir se há alguma alteração nesse processo de plasticidade fenotípica e funcional dos CAFs, uma vez que todas as abordagens estudadas na Parte II desse trabalho foram acerca de marcadores de CAFs do tipo II apenas.

Em resumo, dada a importância da presença dos CAFs no microambiente tumoral para o desenvolvimento e progressão do melanoma, nosso objetivo nessa parte do trabalho foi verificar se os tratamentos *in vitro* de coculturas de B16-F10 e Balb/3T3 com M1 ou M8 seriam capazes de alterar os padrões de integridade celular e de produção de moléculas envolvidas na sinalização entre essas células. Os dados obtidos encontram-se resumidos na tabela 3, sugerindo, portanto, indício de segurança para utilização dos complexos M1 e M8, uma vez que as características de integridade de células consideradas normais (Balb/3T3) não são alteradas após os tratamentos. Esse resultado de não toxicidade para células não tumorais também já havia sido observado anteriormente, quando se verificou que compostos e complexos naturais altamente diluídos apresentaram ação geral no sistema imunológico, melhorando a imunidade celular e humoral, modulando, portanto, a resposta inflamatória, sem citotoxicidade para os macrófagos. (OLIVEIRA et al., 2011).

Os resultados obtidos nos permitiram também identificar um possível mecanismo de ação para o complexo M8.

TABELA 3 – RESUMO DOS RESULTADOS DA PARTE II

		M1	M8
Balb/3T3	Proliferação	—	—
	Viabilidade	—	—
Cocultura Balb/3T3 + B16F10	Marcação para α-SMA	—	—
	Produção/secreção de ácido hialurônico	—	↓
	Marcação para CD44	—	—
	Marcação para N- caderina	—	↓
	Atividade de MMP-2	↓	↓

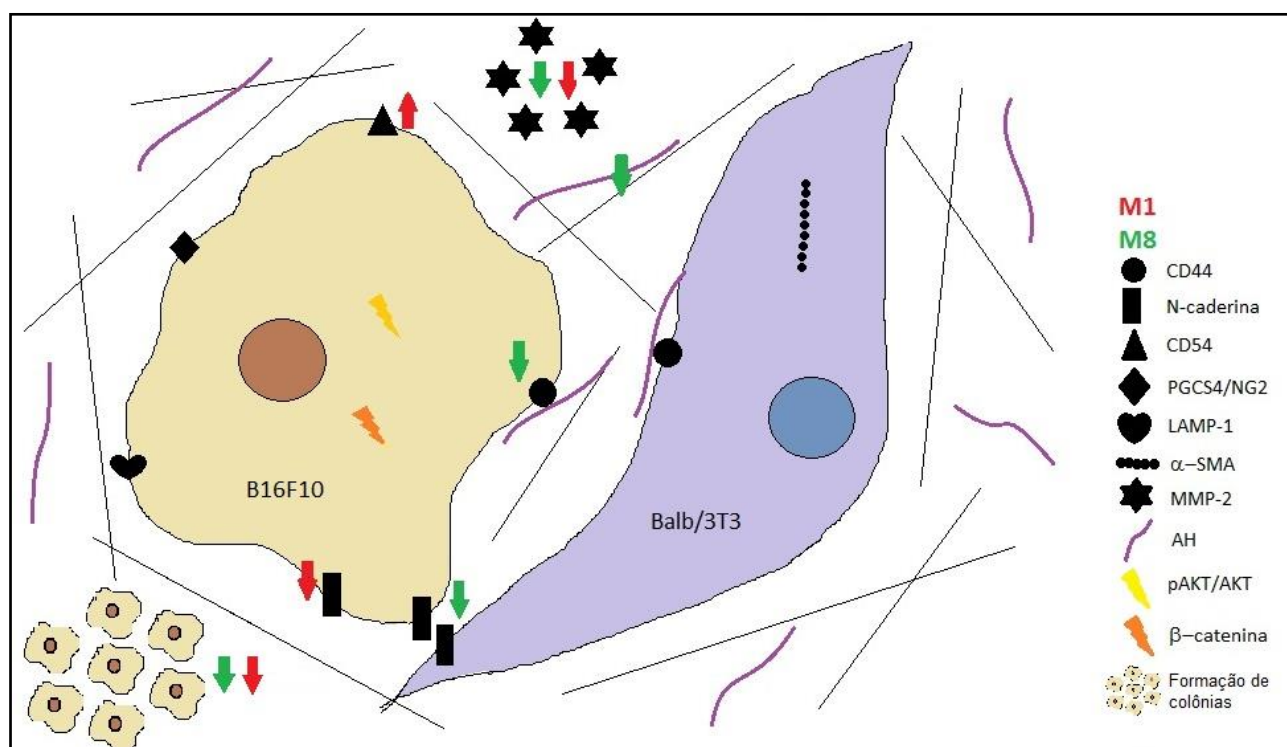
Os traços pretos representam resultados que não foram diferentes estatisticamente quando comparados ao controle. As setas azuis representam diminuição quando comparado ao controle.

FONTE: O autor (2016).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente trabalho encontram-se esquematizados na figura 21. Esses dados nos permitiram delinear o possível mecanismo de ação do complexo M8, o qual mostrou-se capaz de modular a sinalização via AH, reduzindo a secreção dessa molécula tanto em células de melanoma isoladas quanto na cocultura dessas com fibroblastos, reduzindo também a marcação de CD44 nas células tumorais. Dessa forma, M8 levou à redução da atividade da MMP-2 secretada pelas células da cocultura. M8 mostrou-se ainda capaz de modular a interação desses dois tipos celulares através da expressão de N-caderina. E, por fim, foi capaz de reduzir a capacidade tumorigênica das células de melanoma.

FIGURA 21 – ESQUEMA DOS RESULTADOS OBTIDOS



As setas vermelhas e verdes representam aumento ou diminuição após tratamento com M1 ou M8, respectivamente, quando comparado ao controle.

FONTE: O autor (2016).

No que diz respeito ao complexo M1, identificamos uma provável razão para a redução da capacidade migratória das células de melanoma, que foi a modulação da expressão de N-caderina. M1 também foi capaz de reduzir a capacidade tumorigênica dessas células. No modelo de cocultura com fibroblastos, M1 foi capaz de reduzir a atividade da MMP-2 secretada por essas células. Entretanto, esse CNAD não causou

alterações nos parâmetros de comunicação entre essas células e os fibroblastos. Portanto, supomos que seu mecanismo de atuação envolva outras vias de comunicação entre os dois tipos celulares, que não foram investigadas no presente trabalho. Outra hipótese é que *in vivo* seu mecanismo de atuação deva ser mediado por outro(s) tipo(s) celular(es) presente(s) no microambiente tumoral do melanoma. Como M1 modulou a expressão de CD54 em células B16-F10, que é uma molécula de interação com o sistema imunológico, seria interessante futuramente estudar os possíveis efeitos desse CNAD em coculturas com células imunológicas, uma vez que se sabe, por exemplo, que compostos e complexos altamente diluídos podem ativar células da linhagem monocítica *in vitro*. (LOPES et al., 2006; OLIVEIRA, DE et al., 2006, 2008; OLIVEIRA et al., 2011).

Terapias como as altas diluições de compostos naturais, apresentam evidências de eficácia (OBERBAUM et al., 1992, 1997; PREETHI; KUTTAN, 2011), melhoria do bem-estar dos pacientes (BRINKHAUS et al., 2006) e segurança. Apesar de precisarem de confirmações independentes, seus efeitos demonstram ser específicos em muitos experimentos de pesquisa básica. (CLAUSEN et al., 2011). Daí a importância de realizar mais estudos científicos realizados de maneira controlada que confirmem esse potencial, podendo então ser estabelecidas como terapia complementar ou mesmo padrão, uma vez que apresentam baixo custo, são bastante acessíveis e raramente são relatados eventos de hipersensibilidade ou efeitos colaterais. (LEACH, 2004; RAINA et al., 2008).

Sendo assim, o presente trabalho visou o esclarecimento do modo de ação de dois CNADs, M1 e M8, em modelos de melanoma murino *in vitro*, contribuindo para o aumento da produção científica na área das altas diluições.

8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho com tratamento *in vitro* de células de melanoma murino B16-F10, sozinhas ou em cocultura com fibroblastos Balb/3T3, por 96 horas nos permitem concluir que:

- células de melanoma tratadas com M8 apresentam redução na marcação para CD44 e N-caderina, enquanto que o tratamento com M1 reduz a marcação para N-caderina e aumenta para CD54;
- células de melanoma tratadas com M8 reduzem sua capacidade de formação de colônias;
- células de melanoma tratadas com M1 ou M8 não apresentam alteração na marcação para PGCS4/NG2 e LAMP-1, bem como o padrão de ativação/fosforilação de AKT, a marcação para β -catenina e a atividade de MMP-2 secretada no sobrenadante da cultura;
- fibroblastos tratados com M1 ou M8 não apresentam alterações no padrão de proliferação e viabilidade;
- coculturas de B16-F10 e Balb/3T3 tratadas com M8 apresentam inibição da síntese/secreção de AH e também diminuição da marcação para N-caderina, enquanto que o tratamento com M1 não promoveu alteração nessas moléculas;
- coculturas de B16-F10 e Balb/3T3 tratadas com M1 ou M8 não apresentaram alterações na marcação para α -SMA e CD44;
- coculturas de B16-F10 e Balb/3T3 tratadas com M1 ou M8 apresentam redução da atividade da MMP-2 secretada no sobrenadante da cultura.

REFERÊNCIAS

- AARONSON, S. A.; TODARO, G. J. Development of 3T3-like lines from Balb-c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40. **Journal of cellular physiology**, v. 72, p. 141–148, 1968.
- AGARWAL, A. K.; GUDE, R. P.; KALRAIYA, R. D. Regulation of melanoma metastasis to lungs by cell surface Lysosome Associated Membrane Protein-1 (LAMP1) via galectin-3. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 449, p. 332–337, 2014.
- AGARWAL, A. K.; SRINIVASAN, N.; GODBOLE, R.; et al. Role of tumor cell surface lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP1) and its associated carbohydrates in lung metastasis. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 141, p. 1563–1574, 2015.
- AHRENS, T.; ASSMANN, V.; FIEBER, C.; et al. CD44 is the principal mediator of hyaluronic-acid-induced melanoma cell proliferation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 116, n. 1, p. 93–101, 2001.
- AHRENS, T.; SLEEMAN, J. P.; SCHEMPP, C. M.; et al. Soluble CD44 inhibits melanoma tumor growth by blocking cell surface CD44 binding to hyaluronic acid. **Oncogene**, v. 20, p. 3399–3408, 2001.
- ALTOMONTE, M.; GLOGHINI, A.; BERTELA, G.; et al. Differential Expression of Cell Adhesion Molecules CD54/CD11a and CD58/CD2 by Human Melanoma Cells and Functional Role in Their Interaction with Cytotoxic Cells. **Cancer Research**, v. 53, p. 3343–3348, 1993.
- ANDERBERG, C.; PIETRAS, K. On the origin of cancer-associated fibroblasts. **Cell Cycle**, v. 8, n. 10, p. 1461–1465, 2009.
- ANDRADE, L. F. **Avaliação da ação do medicamento M1 sobre o melanoma murino “in vivo”**., 2011. 65 f. Dissertação (mestrado em Biologia Celular e Molecular). Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2011.
- ANDRADE, L. F. DE; MOZELESKI, B.; LECK, A. R.; et al. Inhalation therapy with M1 inhibits experimental melanoma development and metastases in mice. **Homeopathy**, in press.
- AROEIRA, L. S.; AGUILERA, A.; SÁNCHEZ-TOMERO, J. A.; et al. Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 18, n. 7, p. 2004–2013, 2007.
- ARORA, S.; AGGARWAL, A.; SINGLA, P.; JYOTI, S.; TANDON, S. Anti-proliferative effects of homeopathic medicines on human kidney , colon and breast cancer cells. **Homeopathy**, v. 102, p. 274–282, 2013.
- ARAZARENA, I.; BISCHOF, H.; GILBY, D.; et al. In melanoma , beta-catenin acts as suppressor of invasion through a cell-type specific mechanism. **Oncogene**, v. 30, n. 45, p. 4531–4543, 2011.
- ARUFFO, A.; STAMENKOVIC, I.; MELNICK, M.; UNDERHILL, C. B.; SEED, B. Cd44 Is the Principal Cell-Surface Receptor for Hyaluronate. **Cell**, v. 61, p. 1303–1313, 1990.
- ATKINSON, J. M.; RANK, K. B.; ZENG, Y.; et al. Activating the Wnt/ β -Catenin Pathway for the Treatment of Melanoma – Application of LY2090314, a Novel Selective Inhibitor of Glycogen Synthase Kinase-3. **Plos One**, v. 10, n. 4, p. e0125028, 2015.
- AUGSTEN, M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor

microenvironment. **Frontiers in oncology**, v. 4, 2014.

BALKWILL, F. R.; CAPASSO, M.; HAGEMANN, T. The tumor microenvironment at a glance. **Journal of cell science**, v. 125, n. Pt 23, p. 5591–5596, 2012.

BANSAL, R.; TOMAR, T.; OSTMAN, A.; POELSTRA, K.; PRAKASH, J. Selective targeting of interferon gamma to stromal fibroblasts and pericytes as a novel therapeutic approach to inhibit angiogenesis and tumor growth. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 11, n. 11, p. 2419–2428, 2012.

BARKER, H. E.; BIRD, D.; LANG, G.; ERLER, J. T. Tumor-secreted LOXL2 activates fibroblasts through FAK signaling. **Molecular cancer research : MCR**, v. 11, n. 11, p. 1–20, 2013.

BELL, I. R.; SARTER, B.; KOITHAN, M.; et al. Integrative Nanomedicine : Treating Cancer With Nanoscale Natural Products. **Global Adv Health Med**, v. 3, n. 1, p. 36–53, 2014.

BHATTACHARYA, A.; ZHANG, Y. Role of Homeopathy in Integrative Cancer Care. **Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis**, v. 6, n. 6, 2015.

BISHAYEE, K.; SIKDAR, S.; KHUDA-BUKHSH, A. R. Evidence of an Epigenetic Modification in Cell-cycle Arrest Caused by the Use of Ultra-highly-diluted Gonolobus Condurango Extract. **Journal of Pharmacopuncture**, v. 16, n. 4, p. 7–13, 2013.

BLAGOSKLONNY, M. V. Cell Immortality and Hallmarks of Cancer. **Cell cicle**, v. 2, n. 4, p. 296–299, 2003.

BLAGOSKLONNY, M. V. Molecular theory of cancer. **Cancer Biology & Therapy**, v. 4, n. 6, p. 621–627, 2005.

BONNEKOH, B.; WEVERS, A.; JUGERT, F.; MERK, H.; MAHRLE, G. Colorimetric growth assay for epidermal cell cultures by their crystal violet binding capacity. **Archives of Dermatological Research**, v. 281, p. 487–490, 1989.

BRASIL. Farmacopeia Homeopática Brasileira. , v. 3ª edição, 2011.

BRINKHAUS, B.; WILKENS, J. M.; LÜDTKE, R.; et al. Homeopathic arnica therapy in patients receiving knee surgery: results of three randomised double-blind trials. **Complementary therapies in medicine**, v. 14, n. 4, p. 237–246, 2006.

CHIEN, A. J.; MOORE, E. C.; LONSDORF, A. S.; et al. Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. **PNAS**, v. 106, n. 4, p. 1193–1198, 2009.

CHIKRAMANE, P. S.; KALITA, D.; SURESH, A. K.; KANE, S. G.; BELLARE, J. R. Why Extreme Dilutions Reach Non-zero Asymptotes: A Nanoparticulate Hypothesis Based on Froth Flotation. **Langmuir**, v. 28, p. 15864–15875, 2012.

CLAUSEN, J.; WIJK, R. VAN; ALBRECHT, H. Review of the use of high potencies in basic research on homeopathy. **Homeopathy**, v. 100, p. 288–292, 2011.

DANGE, M. C.; AGARWAL, A. K.; KALRAIYA, R. D. Extracellular galectin-3 induces MMP9 expression by activating p38 MAPK pathway via lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP1). **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 404, p. 79–86, 2015.

DERYCKE, L. D. M.; BRACKE, M. E. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, invasion and signalling. **International Journal of Developmental Biology**, v. 48, p. 463–476, 2004.

DIETRICH, A.; TANCZOS, E.; VANSCHIEDT, W.; SCHÖPF, E.; SIMON, J. C. High CD44 surface expression on primary tumours of malignant melanoma correlates with increased metastatic risk and reduced survival. **European Journal of Cancer**, v. 33, n. 6, p. 926–930, 1997.

- EGGERMONT, A. M. M.; ROBERT, C. New drugs in melanoma: it's a whole new world. **European journal of cancer**, v. 47, p. 2150–2157, 2011. Elsevier Ltd.
- FERRARI DE ANDRADE, L. **PESQUISA DE TERAPIAS PARA O MELANOMA EM MODELOS DE METÁSTASES PULMONARES EM CAMUNDONGOS**, 2014. 98 f. Tese (doutorado em Biologia Celular e Molecular). Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- FERRARI DE ANDRADE, L.; MOZELESKI, B.; LECK, A. R.; et al. Inhalation therapy with M1 inhibits experimental melanoma development and metastases in mice. **Homeopathy**, v. 105, p. 109–118, 2016.
- FIDLER, I. J. Biological Behavior of Malignant Melanoma Cells Correlated to Their Survival in Vivo. **Cancer Research**, v. 35, p. 218–224, 1975.
- FIDLER, I. J.; GERSTEN, D. M.; BUDMEN, M. B. Characterization in vivo and in vitro of tumor cells selected for resistance to syngeneic lymphocyte-mediated cytotoxicity. **Cancer research**, v. 36, p. 3160–3165, 1976.
- FLACH, E. H.; REBECCA, V. W.; HERLYN, M.; SMALLEY, K. S. M.; ANDERSON, A. R. A. Fibroblasts contribute to melanoma tumour growth and drug resistance. **Mol Pharm**, v. 8, n. 6, p. 2039–2049, 2011.
- FRENKEL, M. Is There a Role for Homeopathy in Cancer Care? Questions and Challenges. **Curr Oncol Rep**, p. 17–43, 2015.
- FRENKEL, M.; MISHRA, B. A. L. M.; SEN, S.; et al. Cytotoxic effects of ultra-diluted remedies on breast cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 36, p. 395–403, 2010.
- GIAVAZZI, R.; CHIRIVI, R. G.; GAROFALO, A.; et al. Soluble intercellular adhesion molecule 1 is released by human melanoma cells and is associated with tumor growth in nude mice. **Cancer research**, v. 52, p. 2628–2630, 1992.
- GOODISON, S.; URQUIDI, V.; TARIN, D. CD44 cell adhesion molecules. **J Clin Pathol: Mol Pathol**, v. 52, p. 189–196, 1999.
- GRABACKA, M.; PLONKA, P. M.; URBANSKA, K.; REISS, K. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha Activation Decreases Metastatic Potential of Melanoma Cells In vitro via Down-Regulation of Akt. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 10, p. 3028–3036, 2006.
- GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, p. 851–857, 2007.
- GROB, J.-J.; AMONKAR, M. M.; MARTIN-ALGARRA, S.; et al. Patient perception of the benefit of a BRAF inhibitor in metastatic melanoma: quality-of-life analyses of the BREAK-3 study comparing dabrafenib with dacarbazine. **Annals of oncology**, v. 25, p. 1428–1436, 2014.
- GUIMARÃES, F. S. F.; ABUD, A. P. R.; OLIVEIRA, S. M.; et al. Stimulation of lymphocyte anti-melanoma activity by co-cultured macrophages activated by complex homeopathic medication. **BMC cancer**, v. 9, p. 293, 2009.
- GUIMARÃES, F. S. F.; ANDRADE, L. F.; MARTINS, S. T.; et al. In vitro and in vivo anticancer properties of a *Calcarea carbonica* derivative complex (M8) treatment in a murine melanoma model. **BMC cancer**, v. 10, p. 113, 2010.
- GUPTA, S. No hiding in the dark. **Nature**, v. 515, p. 121–123, 2014.
- HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer cell**, v. 21, n. 3, p. 309–322, 2012. Elsevier Inc.

- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646–674, 2011. Elsevier Inc.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.
- HAO, L.; HA, J. R.; KUZEL, P.; GARCIA, E.; PERSAD, S. Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEN pathway through Twist and Snail. **British Journal of Dermatology**, v. 166, n. 6, p. 1184–1197, 2012.
- HART, I. R. The selection and characterization of an invasive variant of the B16 melanoma. **The American journal of pathology**, v. 97, n. 3, p. 587–600, 1979.
- HIDEAKI, N. Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration. **Cell Research**, v. 8, p. 179–186, 1998.
- HOFMANN, U. B.; EGGERT, A. A. O.; BLASS, K.; BRÖCKER, E.-B.; BECKER, J. Stromal cells as the major source for matrix metalloproteinase-2 in cutaneous melanoma. **Arch Dermatol Res**, v. 297, p. 154–160, 2005.
- HOFMANN, U. B.; WESTPHAL, J. R.; MUIJEN, G. N. VAN; RUITER, D. J. Matrix metalloproteinases in human melanoma. **The Journal of investigative dermatology**, v. 115, n. 3, p. 337–344, 2000.
- HOFMANN, U. B.; WESTPHAL, J. R.; ZENDMAN, A. J. W.; et al. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. **Journal of Pathology**, v. 191, p. 245–256, 2000.
- HOLMES, D. The cancer that rises with the sun. **Nature**, v. 515, p. 2011–2012, 2014.
- HOSPITAL ISRAELITA ALBERT EINSTEIN. Medicina Integrativa. Disponível em: <<http://www.einstein.br/hospital/oncologia/nossos-servicos/medicina-integrativa/Paginas/medicina-integrativa.aspx>>. Acesso em: 18/3/2014.
- HSU, M.; ANDL, T.; LI, G.; MEINKOTH, J. L.; HERLYN, M. Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. **Journal of cell science**, v. 113, p. 1535–1542, 2000.
- IIDA, J.; WILHELMSON, K. L.; NG, J.; et al. Cell surface chondroitin sulfate glycosaminoglycan in melanoma: role in the activation of pro-MMP-2 (pro-gelatinase A). **The Biochemical Journal**, v. 403, p. 553–563, 2007.
- INCA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. , 2015.
- ITANO, N.; ZHUO, L.; KIMATA, K. Impact of the hyaluronan-rich tumor microenvironment on cancer initiation and progression. **Cancer Science**, v. 99, n. 9, p. 1720–1725, 2008.
- KAGESHITA, T.; YOSHII, A.; KIMURA, T.; et al. Clinical relevance of ICAM-1 expression in primary lesions and serum of patients with malignant melanoma. **Cancer research**, v. 53, p. 4927–4932, 1993.
- KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420–1428, 2009.
- KAM, Y.; REIJNIAK, K. A.; ANDERSON, A. R. A. Cellular modeling of cancer invasion: Integration of in silico and in vitro approaches. **J Cell Physiol**, v. 227, n. 2, p. 431–438, 2012.
- KAY, J. G.; GRINSTEIN, S. Sensing phosphatidylserine in cellular membranes. **Sensors**, v. 11, p. 1744–1755, 2011.
- KINUGASA, Y.; MATSUI, T.; TAKAKURA, N. CD44 expressed on cancer-associated fibroblasts is a functional molecule supporting the stemness and drug resistance of malignant cancer cells in the tumor microenvironment. **Stem Cells**, v. 32, p. 145–156,

2014.

KLIMP, A. H.; VRIES, E. G. E. DE; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 44, p. 143–161, 2002.

KRISHNAN, V.; BANE, S. M.; KAWLE, P. D.; NARESH, K. N.; KALRAIYA, R. D. Altered melanoma cell surface glycosylation mediates organ specific adhesion and metastasis via lectin receptors on the lung vascular endothelium. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 22, p. 11–24, 2005.

KURCHAT, P.; WICKENHAUSER, C.; GROTH, W.; KRIEG, T.; MAUCH, C. Identification of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main gelatinolytic enzyme in malignant melanoma by in situ zymography. **Journal of Pathology**, v. 197, p. 179–187, 2002.

LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 178–196, 2014.

LARUE, L.; BELLACOSA, A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. **Oncogene**, v. 24, p. 7443–7454, 2005.

LEACH, M. J. A critical review of natural therapies in wound management. **Ostomy wound management**, v. 50, n. 2, p. 36–40, 42, 44–6 passim, 2004.

LECK, A. R. **Efeito de complexo natural altamente diluído sobre o ácido hialurônico e suas implicações em processo inflamatório associado ao melanoma**, 2013. 83 f. Monografia (bacharelado em Ciências Biológicas). Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LEE, J.; JUNG, K.; KIM, Y. S.; PARK, D. Diosgenin inhibits melanogenesis through the activation of phosphatidylinositol-3-kinase pathway (PI3K) signaling. **Life sciences**, v. 81, p. 249–254, 2007.

LEE, M.-S.; YOON, H.-D.; KIM, J.-I.; et al. Dioxinohydroeckol inhibits melanin synthesis through PI3K/Akt signalling pathway in α -melanocyte-stimulating hormone-treated B16F10 cells. **Experimental Dermatology**, v. 21, p. 456–476, 2012.

LI, G.; SATYAMOORTHY, K.; HERLYN, M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. **Cancer Research**, v. 61, n. 9, p. 3819–3825, 2001.

LI, G.; SATYAMOORTHY, K.; MEIER, F.; BERKING, C.; HERLYN, M. Function and regulation of melanoma – stromal fibroblast interactions: when seeds meet soil. **Oncogene**, v. 22, p. 3162–3171, 2003.

LOPES, L.; GODOY, L. M. F.; OLIVEIRA, C. C. DE; et al. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron (Oxford, England : 1993)**, v. 37, n. 3, p. 277–287, 2006.

LOTAN, R.; RAZ, A. Low Colony Formation in Vivo and in Culture as Exhibited by Metastatic Melanoma Cells Selected for Reduced Homotypic Aggregation. **Cancer Research**, v. 43, n. May, p. 2088–2093, 1983.

MACLAUGHLIN, B. W.; GUTSMUTHS, B.; PRETNER, E.; et al. Effects of Homeopathic Preparations on Human Prostate Cancer Growth in Cellular and Animal Models. **Integrative Cancer Therapies**, v. 5, n. 4, p. 362–372, 2006.

MARTINS, J. R. M.; PASSEROTTI, C. C.; MACIEL, R. M. B.; et al. Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. **Analytical biochemistry**, v. 319, n. 1, p. 65–72, 2003.

- MARZESE, D. M.; LIU, M.; HUYNH, J. L.; et al. Brain metastasis is predetermined in early stages of cutaneous melanoma by CD44v6 expression through epigenetic regulation of the spliceosome. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 28, p. 82–93, 2014.
- MAVERAKIS, E.; CORNELIUS, L. A.; BOWEN, G. M.; et al. Metastatic Melanoma – A Review of Current and Future Treatment Options. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 95, 2015.
- MEYSKENS, F. J. Human melanoma colony formation in soft agar . **Prog Clin Biol Res**, v. 48, p. 85–99, 1980.
- MEYSKENS, F. L.; SALMON, S. E. Inhibition of Human Melanoma Colony Formation by Retinoids. **Cancer Research**, v. 39, n. October, p. 4055–4057, 1979.
- MIELE, M. E.; BENNETT, F.; MILLER, B. E.; WELCH, D. R. Enhanced metastatic ability of TNF-alpha-treated malignant melanoma cells is reduced by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) antisense oligonucleotides. **Experimental cell research**, v. 214, p. 231–241, 1994.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS**. 2ª edição ed. Brasília-DF, 2015.
- MIO, K.; STERN, R. Reverse hyaluronan substrate gel zymography procedure for the detection of hyaluronidase inhibitors. **Glycoconjugate journal**, v. 17, p. 761–766, 2000.
- MORO, N.; MAUCH, C.; ZIGRINO, P. Metalloproteinases in melanoma. **European Journal of Cell Biology**, v. 93, p. 23–29, 2014.
- MUMMERT, M. E.; MUMMERT, D. I.; ELLINGER, L.; TAKASHIMA, A. Functional roles of hyaluronan in B16-F10 melanoma growth and experimental metastasis in mice. **Molecular cancer therapeutics**, v. 2, p. 295–300, 2003.
- NAMVAR, F.; RAHMAN, H. S.; MOHAMAD, R.; et al. Cytotoxic Effects of Biosynthesized Zinc Oxide Nanoparticles on Murine Cell Lines. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–11, 2015.
- NATALI, P.; NICOTRA, M. R.; CAVALIERE, R.; et al. Differential expression of intercellular adhesion molecule 1 in primary and metastatic melanoma lesions. **Cancer Research**, v. 50, p. 1271–1278, 1990.
- NEGMADJANOV, U.; GODIC, Z.; RIZVI, F.; et al. TGF- β 1-Mediated Differentiation of Fibroblasts Is Associated with Increased Mitochondrial Content and Cellular Respiration. **Plos One**, v. 10, n. 4, p. 1–12, 2015.
- NIH. Cancer Classification. Disponível em: <<http://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>>. Acesso em: 14/7/2016.
- NIKOLAOU, V.; STRATIGOS, A. J. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. **British journal of dermatology**, v. 170, p. 11–19, 2014.
- OBERBAUM, M.; MARKOVITS, R.; WEISMAN, Z.; KALINKEVITS, A.; BENTWICH, Z. Wound healing by homeopathic silica dilutions in mice. **Harefuah**, v. 123, n. 3-4, p. 79–82, 1992.
- OBERBAUM, M.; WEISMAN, Z.; KALINKOVICH, A.; BENTWICH, Z. Healing Chronic Wounds Performed on Mouse Ears Using Silica (SiO₂) as a Homeopathic Remedy. **Signals and Images**, p. 191–199, 1997.
- OH, E. Y.; JANG, J. Y.; CHOI, Y. H.; CHOI, Y. W.; CHOI, B. T. Inhibitory effects of 1-O-methyl-fructofuranose from Schisandra chinensis fruit on melanogenesis in B16F0 melanoma cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 132, p. 219–224, 2010. Elsevier

Ireland Ltd.

ÖHLUND, D.; ELYADA, E.; TUVESON, D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. **The Journal of experimental medicine**, v. 211, n. 8, p. 1503–1523, 2014.

OLIVEIRA, C. C. DE; ABUD, A. P. R.; OLIVEIRA, S. M. DE; et al. Developments on drug discovery and on new therapeutics: highly diluted tinctures act as biological response modifiers. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 11, p. 101, 2011.

OLIVEIRA, C. C. DE; OLIVEIRA, S. M. DE; GODOY, L. M. F.; GABARDO, J.; BUCHI, D. D. F. Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. **The Journal of infection**, v. 52, n. 6, p. 420–32, 2006.

OLIVEIRA, C. C. DE; OLIVEIRA, S. M. DE; GOES, V. M.; et al. Gene expression profiling of macrophages following mice treatment with an immunomodulator medication. **Journal of cellular biochemistry**, v. 104, p. 1364–1377, 2008.

OLIVEIRA, S. M. DE; OLIVEIRA, C. C. DE; ABUD, A. P. R.; et al. Mercurius solubilis: Actions on macrophages. **Homeopathy**, v. 100, p. 228–236, 2011.

PASONEN-SEPPANEN, S.; TAKABE, P.; EDWARD, M.; et al. Melanoma cell-derived factors stimulate hyaluronan synthesis in dermal fibroblasts by upregulating HAS2 through PDGFR-PI3K-AKT and p38 signaling. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 138, p. 895–911, 2012.

PBHRF. The Banerji Protocols Of Treatment. Disponível em: <<http://www.pbhrfindia.org/a-new-beginning-2/10-banerji-protocols-of-treatment.html>>. Acesso em: 12/3/2016.

PEDROSO, J. E. D. S.; BRASIL, O. C. DO; MARTINS, J. R. M.; NADER, H. B.; SIMÕES, M. D. J. Analysis of hyaluronic acid concentration in rat vocal folds during estral and gravidic puerperal cycles. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 75, n. 5, p. 654–659, 2009.

POTRICH, F. B. **Complexos naturais altamente diluídos reduzem fenótipo metastático de células de melanoma murino (B16F10)**, 2014. 126 f. Tese (doutorado em Biologia Celular e Molecular). Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

PREETHI, K. C.; KUTTAN, R. Wound healing activity of flower extract of Calendula officinalis. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 20, n. 1, p. 73–80, 2011.

PRICE, M. A; COLVIN WANSHURA, L. E.; YANG, J.; et al. CSPG4, a potential therapeutic target, facilitates malignant progression of melanoma. **Pigment cell & melanoma research**, v. 24, n. 6, p. 1148–1157, 2011.

QI, J.; CHEN, N.; WANG, J.; SIU, C. Transendothelial Migration of Melanoma Cells Involves N-Cadherin-mediated Adhesion and Activation of the -Catenin Signaling Pathway. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. 9, p. 4386–4397, 2005.

QUINN, J. A.; AMJED, S. B.; CARACHI, R.; EDWARD, M. Melanoma cell regulation of fibroblast hyaluronan synthesis through the release of emmprin and stratifin: A role in modulation of tumor stroma, promoting tumor invasion. **Journal of investigative dermatology**, v. 133, p. 223, 2013.

RAINA, R.; PARWEZ, S.; VERMA, P. K.; PANKAJ, N. K. Medicinal Plants and their Role in Wound Healing. **Online Veterinary Journal**, v. 3, n. 1, 2008.

RAY, J. M.; STETLER-STEVENSON, W. G. Gelatinase A activity directly modulates melanoma cell adhesion and spreading. **The EMBO Journal**, v. 14, n. 5, p. 908–917, 1995.

- RAZ, A; MCLELLAN, W. L.; HART, I. R.; et al. Cell surface properties of B16 melanoma variants with differing metastatic potential. **Cancer Research**, v. 40, p. 1645–1651, 1980.
- ROBERT, C.; RIBAS, A.; WOLCHOK, J. D.; et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. **Lancet**, v. 384, p. 1109–1117, 2014.
- ROSNER, K.; MEHREGAN, D. R.; KIROU, E.; et al. Melanoma Development and Progression Are Associated with Rad6 Upregulation and β -Catenin Relocation to the Cell Membrane. **Journal of skin cancer**, v. 2014, 2014.
- SAITO, R. A.; MICKE, P.; PAULSSON, J.; et al. Forkhead box F1 regulates tumor-promoting properties of cancer-associated fibroblasts in lung cancer. **Cancer Research**, v. 70, n. 7, p. 2644–2654, 2010.
- SATO, D. Y. O.; WAL, R.; OLIVEIRA, C. C. DE; et al. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication. **Homeopathy**, v. 94, n. 1, p. 26–32, 2005.
- SATYAMOORTHY, K.; LI, G.; VAIDYA, B.; PATEL, D.; HERLYN, M. Insulin-like Growth Factor-1 Induces Survival and Growth of Biologically Early Melanoma Cells through Both the Mitogen-activated Protein Kinase and β -Catenin Pathways. **Cancer research**, v. 61, p. 7318–7324, 2001.
- SCHADENDORF, D.; FISHER, D. E.; GARBE, C.; et al. Melanoma. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 1, n. April, p. 1–20, 2015.
- SCHEIBENBOGEN, C.; KEILHOLZ, U.; MEUER, S.; et al. Differential expression and release of LFA-3 and ICAM-1 in human melanoma cell lines. **International journal of cancer**, v. 54, p. 494–498, 1993.
- SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I.; FRISE, E.; et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, 2012.
- SHIM, D. H.; LIM, J. W.; KIM, H. Differentially Expressed Proteins in Nitric Oxide-Stimulated NIH / 3T3 Fibroblasts : Implications for Inhibiting Cancer Development. **Yonsei Medical Journal**, v. 56, n. 2, p. 563–571, 2015.
- SHIM, S.-H.; HAH, J. H.; SUNG, M.-W. Abstract A6: Cancer-associated fibroblasts (CAF) expressing CD44 high increased the aggressiveness of cancer cells. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 14, supplement 2, p. A6, 2010.
- SINNBERG, T.; MENZEL, M.; EWERTH, D.; et al. Beta-Catenin Signaling Increases During Melanoma Progression and Promotes Tumor Cell Survival and Chemoresistance. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e23429, 2011.
- SIRONEN, R. K.; TAMMI, M.; TAMMI, R.; et al. Hyaluronan in human malignancies. **Experimental cell research**, v. 317, p. 383–391, 2011.
- SLOMINSKI, A.; TOBIN, D. J.; SHIBAHARA, S.; WORTSMAN, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiological reviews**, v. 84, p. 1155–1228, 2004.
- SMALLEY, K. S. M. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? **International journal of cancer**, v. 104, p. 527–532, 2003.
- SPAETH, E. L.; LABAFF, A. M.; TOOLE, B. P.; et al. Mesenchymal CD44 expression contributes to the acquisition of an activated fibroblast phenotype via TWIST activation in the tumor microenvironment. **Cancer Research**, v. 73, n. 17, p. 5347–5359, 2013.
- SUNILA, E. S.; KUTTAN, G.; KC, P.; KUTTAN, R. Effect of Homeopathic Medicines on

Transplanted Tumors in Mice. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 8, p. 390–394, 2007.

SUYAMA, K.; SHAPIRO, I.; GUTTMAN, M.; HAZAN, R. B. A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. **Cancer Cell**, v. 2, p. 301–314, 2002.

TAKAHASHI, K.; ETO, H.; TANABE, K. K. Involvement of CD44 in matrix metalloproteinase-2 regulation in human melanoma cells. **International journal of cancer**, v. 80, p. 387–395, 1999.

TAKEICHI, M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. **Annual review of biochemistry**, v. 59, p. 237–252, 1990.

TOTH, M.; FRIDMAN, R. Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by Gelatin Zymography. **Methods in Molecular Medicine**, v. 57, p. 163–174.

UPADHYAY, R. P.; NAYAK, C. Homeopathy emerging as nanomedicine. **Int J High Dilution Res**, v. 10, n. 37, p. 299–310, 2011.

USLU, B.; BILTEKIN, B.; DENIR, S.; et al. Differences between Solution and Membrane Forms of Chitosan on the In Vitro Activity of Fibroblasts. **Balkan Medical Journal**, v. 32, p. 69–78, 2015.

VAUX, D. L.; FIDLER, F.; CUMMING, G. Replicates and repeats — what is the difference and is it significant? A brief discussion of statistics and experimental design. **EMBO reports**, v. 13, n. 4, p. 291–296, 2012.

VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M. K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 54, p. 10–14, 2011.

VOELCKER, V.; GEBHARDT, C.; AVERBECK, M.; et al. Hyaluronan fragments induce cytokine and metalloprotease upregulation in human melanoma cells in part by signalling via TLR4. **Experimental dermatology**, v. 17, p. 100–107, 2007.

WAISSE, S. The science of high dilutions in historical context. **Homeopathy**, v. 101, p. 129–137, 2012.

WANG, J.; SVENDSEN, A.; KMIECIK, J.; et al. Targeting the NG2/CSPG4 proteoglycan retards tumour growth and angiogenesis in preclinical models of GBM and melanoma. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e23062, 2011.

WEISSGERBER, T. L.; MILIC, N. M.; WINHAM, S. J.; GAROVIC, V. D. Beyond Bar and Line Graphs: Time for a New Data Presentation Paradigm. **PLOS Biology**, v. 13, n. 4, p. e1002128, 2015.

WHEELOCK, M. J.; SHINTANI, Y.; MAEDA, M.; FUKUMOTO, Y.; JOHNSON, K. R. Cadherin switching. **Journal of cell science**, v. 121, p. 727–735, 2008.

WHO. The top 10 causes of death. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>. Acesso em: 18/3/2014.

WHO. Cancer. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 18/3/2014a.

WHO. Health effects of UV radiation. Disponível em: <http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html>. Acesso em: 18/3/2014b.

WILLENBERG, A.; SAALBACH, A.; SIMON, J. C.; ANDEREGG, U. Melanoma cells control HA synthesis in peritumoral fibroblasts via PDGF-AA and PDGF-CC: impact on melanoma cell proliferation. **Journal of investigative dermatology**, v. 132, p. 385–393, 2012. Nature Publishing Group.

XU, J.; LU, Y.; QUI, S.; CEN, Z.; FAN, Z. A novel role of EMMPRIN/CD147 in transformation of quiescent fibroblasts to cancer-associated fibroblasts by breast cancer cells. **Cancer Lett.**, v. 335, n. 2, p. 380–386, 2013.

YAJIMA, I.; KUMASAKA, M. Y.; THANG, N. D.; et al. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy. **Dermatology research and practice**, v. 2012, p. 1–5, 2012.

YANG, J.; PRICE, M. A.; NEUDAUER, C. L.; et al. Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan enhances FAK and ERK activation by distinct mechanisms. **Journal of Cell Biology**, v. 165, n. 6, p. 881–891, 2004.

ZAIDI, M. R.; DAY, C.-P.; MERLINO, G. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. **Journal of investigative dermatology**, v. 128, p. 2381–2391, 2008.

ZHANG, P.; FU, C.; BAI, H.; SONG, E.; SONG, Y. CD44 variant , but not standard CD44 isoforms , mediate disassembly of endothelial VE-cadherin junction on metastatic melanoma cells. **FEBS Letters**, v. 588, p. 4573–4582, 2014.

ZHOU, L.; YANG, K.; ANDL, T.; WICKETT, R. R.; ZHANG, Y. Perspective of Targeting Cancer-Associated Fibroblasts in Melanoma. **Journal of Cancer**, v. 6, p. 717–726, 2015.

ANEXOS

ANEXO 1. Protocolo para marcação de B16-F10 ou cocultura de B16-F10 + 3T3 para CD44 (marcação externa) – CITOMETRIA DE FLUXO

Em gelo...

- Raspar as células com rodinho e passar para tubos de citômetro já identificados
- Lavar 3X com PBS
- Lavar 1X com PBS 1% de BSA
- Incubar com anticorpo primário IgG2b anti-CD44 (BD, 550538) produzido em rat, diluído 1:100 em PBS 1% de BSA por 1 hora (50 µl/tubo)
- Lavar 1X com PBS
- Fixar com paraformaldeído (de ampola) 2% em PBS (200ul/tubo) por 30 min à temperatura ambiente
- Lavar 1X com PBS
- Lavar 1X com PBS 0,1M de glicina (fazer na hora!) por 10 min
- Incubar com PBS BSA por 20 min
- Incubar com anticorpo secundário anti-rat IgG conjugado com FITC (Jackson 112-095-003) produzido em goat, diluído 1:200 em PBS por 30 min no escuro (50 µl/tubo)
- Lavar 1X com PBS
- Ressuspender em 400 µl de PBS
- Passar no citômetro

ANEXO 2. Protocolo para marcação de B16-F10 para N-caderina (marcação interna) – CITOMETRIA DE FLUXO

Em gelo...

- Raspar as células da garrafa pequena com rodinho e passar para tubos de citômetro já identificados
- Lavar 3X com PBS
- Fixar com paraformaldeído (de ampola) 2% em PBS (200ul/tubo) por 30 min à temperatura ambiente
- Lavar 1X com PBS

- Lavar 1X com PBS 0,1M de glicina (fazer na hora!) por 10 min
- Incubar com PBS 0,01% de saponina e 1% de BSA por 20 min
- Incubar com anticorpo primário IgG anti-N-caderina (Santa Cruz sc-31030) produzido em goat, diluído 1:50 em PBS 1% de BSA e 0,01% de saponina por 1 hora (50 µl/tubo)
- Lavar 2X com PBS 0,01% de saponina e 1% de BSA
- Incubar com anticorpo secundário anti-goat IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen A11078, lote 1069847) produzido em rabbit, diluído 1:300 em PBS 0,01% de saponina por 30 min no escuro (50 µl/tubo)
- Lavar 1X com PBS 0,01% de saponina
- Ressuspender em 400 µl de PBS
- Passar no citômetro

ANEXO 3. Protocolo para marcação de B16-F10 para LAMP-1 (marcação externa) – CITOMETRIA DE FLUXO

Em gelo...

- **Raspar as células com rodinho e passar para tubos de citômetro já identificados**
- **Lavar 3X com PBS**
- **Lavar 1X com PBS 1% de BSA**
- **Incubar com anticorpo primário IgG anti-LAMP-1 (C-20) (Santa Cruz, sc-8098) produzido em goat, diluído 1:50 em PBS 1% de BSA por 1 hora (50 µl/tubo)**
- **Lavar 1X com PBS**
- Fixar com paraformaldeído (de ampola) 2% em PBS (200ul/tubo) por 30 min à temperatura ambiente
- Lavar 1X com PBS
- Lavar 1X com PBS 0,1M de glicina (fazer na hora!) por 10 min
- Incubar com PBS BSA por 20 min
- Incubar com anticorpo secundário anti-goat IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A11078) produzido em rabbit, diluído 1:300 em PBS por 30 min no escuro (50 µl/tubo)
- Lavar 1X com PBS
- Ressuspender em 400 µl de PBS
- Passar no citômetro

ANEXO 4. Protocolo para marcação de B16-F10 para CD54 (marcação externa) – CITOMETRIA DE FLUXO

Em gelo...

- Raspar as células com rodinho e passar para tubos de citômetro já identificados
- Lavar 3X com PBS
- Incubar 30 minutos com PBS 1% de BSA
- Incubar com anticorpo Hamster anti-mouse CD54 conjugado com PE (BD, 553253) diluído 1:100 em PBS 1% de BSA por 45 minutos (50 µl/tubo)
- Adicionar 6,24 µl/tubo de paraformaldeído 32% (fica 2% no final)
- Incubar por 15 minutos
- Lavar 1X com PBS
- Ressuspender em 400 µl de PBS
- Passar no citômetro

ANEXO 5. Protocolo para marcação de B16-F10 para NG2 (marcação interna) – CITOMETRIA DE FLUXO

Em gelo...

- Raspar as células da garrafa pequena com rodinho e passar para tubos de citômetro já identificados
- Lavar 3X com PBS
- Fixar com paraformaldeído (de ampola) 2% em PBS (200ul/tubo) por 30 min à temperatura ambiente
- Lavar 1X com PBS
- Lavar 1X com PBS 0,1M de glicina (fazer na hora!) por 10 min
- Incubar com PBS 0,01% de saponina e 1% de BSA por 20 min
- Incubar com anticorpo primário IgG anti-NG2 (Santa Cruz sc-30921) produzido em goat, diluído 1:50 em PBS 1% de BSA e 0,01% de saponina por 1 hora (50 µl/tubo)
- Lavar 2X com PBS 0,01% de saponina e 1% de BSA
- Incubar com anticorpo secundário anti-goat IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen A11078, lote 1069847) produzido em rabbit, diluído 1:300 em PBS 0,01% de saponina por 30 min no escuro (50 µl/tubo)

- Lavar 1X com PBS 0,01% de saponina
- Ressuspender em 400 µl de PBS
- Passar no citômetro

ANEXO 6. Protocolo para marcação de B16-F10 para beta-catenina e faloidina
- CONFOCAL

OBS: usar PBS com sais de qualidade, preparar SOLUÇÕES FRESCAS!!!

- Lavar 5X com PBS (Sigma, pastilhas) a 37°C
- Fixar com paraformaldeído (de ampola) 2% em PBS (200ul/pç) por 30 min à temperatura ambiente
- Lavar 2X com PBS
- Lavar 1X com PBS 0,1M de glicina (**fazer na hora e acertar o pH!**)
- Lavar 2X com PBS
- Lavar 1X com PBS 0,01% de saponina e 1% de BSA (Sigma) por 20 min em agitador
- Incubar com anticorpo primário IgG anti-beta-catenina (Millipore 06-734, lote DAM1810813) produzido em rabbit, diluído 1:200 em PBS 0,01% de saponina e 1% de BSA por 1 hora (50ul/lamínula invertendo a lamínula sobre parafilm)
- Lavar 3X com PBS 0,01% de saponina
- Lavar 1X com PBS 0,01% de saponina e 1% de BSA
- Lavar 2X com PBS 0,01% de saponina
- Incubar com anticorpo secundário anti-IgG de rabbit conjugado com Alexa Fluor 647 (Invitrogen A31573, lote 439377) produzido em donkey, diluído 1:300 em PBS 0,01% de saponina por 1 hora no escuro
- Lavar 2X com PBS 0,01% de saponina
- Incubar com faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes A12379, lote 1179855) diluída 1:500 por 30 min no escuro
- Lavar 5X com PBS 0,01% de saponina
- Lavar rapidamente com água MiliQ
- Montar a lâmina com Prolong Gold com DAPI (Molecular Probes P36931, lote 1190002) (**OBS: tirar do freezer antes e deixar ficar à temperatura ambiente naturalmente**)
- Deixar overnight a 4°C

- Lacrar com esmalte

ANEXO 7. Protocolo para marcação de B16-F10 para E e N-caderinas - CONFOCAL

Em gelo...

- Lavar 5X com meio sem soro
- Incubar com anticorpo primário IgG1 anti-E-caderina (Novocasta NCL-E-Cad) produzido em mouse, diluído 1:100 em meio de cultura 1% de BSA por 1 hora
- Lavar 3X com PBS
- Lavar 1X com PBS 1% de BSA
- Lavar 3X com PBS
- Fixar com paraformaldeído (de ampola) 2% em PBS (200ul/pç) por 30 min à temperatura ambiente
- Lavar 2X com PBS
- Lavar 1X com PBS 0,1M de glicina (fazer na hora!)
- Lavar 2X com PBS
- Incubar com anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado com Alexa Fluor 633 (Invitrogen A21050, lote 1138571) produzido em goat, diluído 1:300 em PBS por 1 hora no escuro
- Lavar 1X com PBS 0,01% de saponina e 1% de BSA por 20 min em agitador
- Incubar com anticorpo primário IgG anti-N-caderina (Santa Cruz sc-31030) produzido em goat, diluído 1:200 em PBS 1% de BSA e 0,01% de saponina por 1 hora
- Lavar 3X com PBS 0,01% de saponina
- Lavar 1X com PBS 0,01% de saponina e 1% de BSA
- Lavar 2X com PBS 0,01% de saponina
- Incubar com anticorpo secundário anti-goat IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen A11078, lote 1069847) produzido em rabbit, diluído 1:300 em PBS 0,01% de saponina por 1 hora no escuro
- Lavar 5X com PBS 0,01% de saponina
- Lavar rapidamente com água MiliQ
- Montar a lâmina com Prolong Gold com DAPI (OBS: tirar do freezer antes e deixar ficar à temperatura ambiente naturalmente)
- Deixar overnight a 4°C

- Lacrar com esmalte
- Observar no microscópio.

ANEXO 8. Protocolo para extração de proteínas celulares totais

- Lavar as garrafas com PBS a 37°C 3 vezes;
- Por as garrafas sobre o gelo;
- Adicionar 500 µL de tampão RIPA contendo inibidores de proteases e fosfatases*;
- Raspar as células aderentes com rodinho e transferir para microtubo gelado;
- Furar a tampa do microtubo;
- Ferver por 5 minutos;
- Centrifugar os microtubos a 20000 g por 30 minutos;
- Retirar 400 µL do sobrenadante e fazer alíquotas de 100 µL cada;
- Congelar a -20°C.

***Tampão RIPA**

- ✓ 50mM Tris-HCl pH 8
- ✓ 150 mM NaCl
- ✓ 0,1% SDS
- ✓ 0,25% deoxicolato de sódio
- ✓ 4% CHAPS
- ✓ 150 µL coquetel inibidor de protease COMPLETE, MINI 7X (Roche, 04693124001) para cada 1 mL de tampão
- ✓ 100 µL cocktail inibidor de fosfatase PhosSTOP 10X (Roche, 04906845001)
- ✓ H₂O ultrapura

ANEXO 9. Protocolo para dosagem de proteínas usando o Pierce™ BCA Protein Assay Kit

- Preparar as diluições dos padrões de BSA em PBS estéril de acordo com o manual do kit (Thermo Scientific, 23225) - (tabela 1, working range = 20-2000 µg/mL)

OBS: guardar o que sobrar após o uso a -20°C.

- Preparar working reagente (WR):

Volume de WR = (9 padrões + X amostras) x 2 replicatas x 0,2 mL/amostra)

Volume de WR = 50 partes de reagente A + 1 parte de reagente B

Após agitação a mistura deve ficar verde clara!

- Em uma placa de 96 poços adicionar em cada poço:
200 μ L de WR + 25 μ L de cada padrão da curva ou amostra
- Homogeneizar e agitar por 30 segundos
- Vedar a placa com parafilm e incubar em banho-maria a 37°C por 30 minutos
- Medir a absorbância dos poços em espectrofotômetro de microplacas Epoch (BioTek) em comprimento de onda de 562nm.

ANEXO 10. Protocolo para western blot

OBS: TODAS as soluções para eletroforese devem ser feitas com água Mili-Q, para evitar contaminações proteicas!

- **Tampão de amostra 5X [] – BANCADA**

- ✓ Tris-HCl 1,5 M (pH 6,8) ----- 1 mL
- ✓ Glicerol ----- 2,5 mL
- ✓ SDS ----- 0,5 g
- ✓ 2-mercaptoetanol----- 2,5 mL
- ✓ Água Milli-Q ----- 1,5 mL
- ✓ Azul de bromofenol ----- uma “pitada”

- **Tris-HCl 1,5 M pH 6,8 - GELADEIRA**

- ✓ Tris base ----- 0,908 g
- ✓ HCl puro ----- 592 μ L
- ✓ Água Milli-Q ----- 4,4 mL

- **Tris HCl 1,5M com SDS 0,4% pH 8,8 - GELADEIRA**

Para preparar uma solução de 50 ml:

- ✓ Tris base ----- 9,086 g
- ✓ SDS ----- 0,2 g
- ✓ HCL puro ----- 1,07 mL
- ✓ Água Milli-Q ----- 49 mL

Conferir o pH!

- **Tris HCl 0,5M com SDS 0,4% pH 6,8 - GELADEIRA**

Para preparar uma solução de 50 mL:

- ✓ Tris base ----- 3,029 g
- ✓ SDS ----- 0,2 g
- ✓ HCL puro ----- 1,97 mL
- ✓ Água Milli-Q ----- 48 mL

Conferir o pH!

- **Tampão de corrida/transferência (5 X concentrado) – BANCADA pH 8,3**

- ✓ Glicina----- 71,52 g
- ✓ Tris----- 15 g
- ✓ HCL puro ----- 4 mL
- ✓ H2O Mili-Q----- 1 L

Conferir o pH!

- **Tampão de corrida 1 X concentrado – GELADEIRA pH 8,3**

- ✓ Tampão de corrida/transferência 5 X concentrado -----200 mL
- ✓ SDS ----- 1 g
- ✓ H₂O ----- 800 mL

Conferir o pH!

- **Tampão de transferência 1 X concentrado – GELADEIRA pH~8,0**

- ✓ Tampão de corrida/transferência 5 X concentrado ----- 240 mL
- ✓ Metanol ----- 240 mL
- ✓ H₂O ----- 720 mL

Conferir o pH!

- **Acrilamida 30% - GELADEIRA**

OBS: TÓXICO enquanto pó e líquido!!!

- ✓ Acrilamida----- 7,5g
- ✓ Bis-acrilamida----- 0,2g
- ✓ H2O Mili-Q----- 25mL

OU

- ✓ Acrilamida 40% ----- 18,75 mL
- ✓ Bis-acrilamida----- 0,2g
- ✓ H2O Mili-Q----- 6,25 mL

- **TBS 10 X concentrado – GELADEIRA pH 7,5**

- ✓ Tris ----- 15,1425 g
- ✓ NaCl ----- 43,83 g
- ✓ HCl puro ----- 8,3 mL
- ✓ H₂O ----- 491,7 mL

Conferir o pH!

- **TBST**

(25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% v/v Tween 20, pH 7,5)

- ✓ TBS 10 X concentrado ----- 15 mL
- ✓ H₂O ----- 135 mL
- ✓ Tween 20 ----- 150 µL

- **TBST / 5% BSA**

- ✓ TBST ----- 30 mL
- ✓ BSA ----- 1,5 g

OBS: **filtrar** para evitar manchas na membrana!

PREPARO DO GEL E CORRIDA

OBS: Lavar os materiais antes e passar álcool 70%!!!

1º) Gel de separação - 10% de acrilamida!

2 géis	
Acrilamida 30%	5 mL
H ₂ O milli-Q	6 mL
Tris 1,5M <u>pH 8,8</u> e 0,4% de SDS	3,75 mL
TEMED	15 µL
APS	150 µL
Volume Total	15 mL

Para a montagem dos vidros posicionar o vinco da linha branca para cima (OBS: pode passar vaselina no contorno dos vidros se estiver vazando ou vedar com parafilm). Na montagem do sistema posicionar a abertura do vidro para dentro, alinhar bem os dois vidros e prender no suporte. Colocar vidros dos dois lados do sistema (mesmo se só fizer um gel). Colocar sobre o silicone e prender os pinos. Testar com H₂O se está

vazando. Jogar a água e secar com papel filtro.

Após o preparo da solução gel, verificar se não está quente e colocar 5 mL entre os vidros, completar com metanol para tirar as bolhas. Quando polimerizar, descartar o metanol, lavar 1X com água e adicionar o gel de entrada.

OBS: se fizer apenas um gel, usar aparato de acrílico do outro lado ou fazer uma base de gel de corrida no outro vidro para evitar vazamento de tampão!

2º) Gel de Entrada

2 géis	
Acrilamida 30%	1,5 mL
H ₂ O milli-Q	6,3 mL
Tris 0,5M pH 6,8 e 0,4% de SDS	1,14 mL
TEMED	15 µL
APS	150 µL
Volume Total	9,1 mL

Adicionar o gel de entrada sobre o gel de corrida e colocar o pente até ~1 cm acima do limite entre os géis. Cobrir o sistema com um papel toalha úmido para evitar ressecamento do gel de um dia para outro.

- Ferver as amostras por 3 minutos na capela com a tampa dos tubos furada para não estourar.
- Adicionar nos poços do gel 40 µL de amostra (~20 µg de proteínas totais) já diluída em tampão de amostra redutor (1 X [] no final).

OBS: não usar os poços das extremidades, pois corre torto!!!

- Adicionar 5 µL de padrão de peso molecular misturado com 35 µL de tampão de amostra não-redutor 1 X [] no segundo e penúltimo poços do gel.
- Nos poços que ficarem sem amostra (inclusive os das extremidades) colocar 40 µL de tampão de amostra não-redutor 1X []!
- Colocar tampão de corrida 1 X [] entre os géis (150 mL), com cuidado para não entrar no gel! Preencher o volume dos poços com tampão de corrida 1 X [] e depois encher os compartimentos central e externo com o mesmo tampão.
- Fechar o sistema e ligar os cabos de acordo com as cores.

Polo + VERMELHO

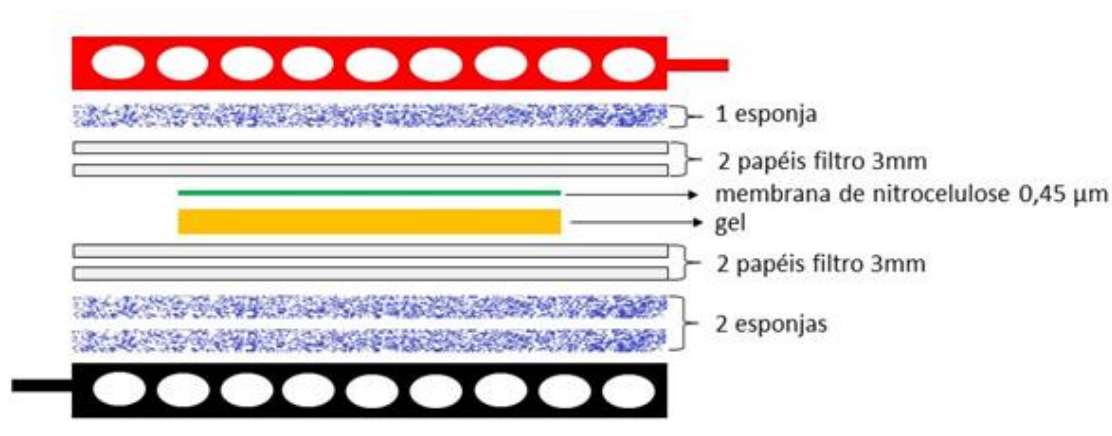
Polo - PRETO

- Correr o gel por 4 horas a 30 mA em banho de gelo.

OBS: se estiver fazendo bolhas é porque está correndo.

TRANSFERÊNCIA

- Retirar os géis do sistema de corrida e montar o sanduíche para transferência de acordo com o esquema abaixo, molhando cada componente em tampão de transferência 1 X concentrado antes de adicionar ao sanduíche.



- Remover as bolhas do sanduíche com auxílio de um bastão de madeira;
- Posicionar os sanduíches na cuba e preenche-la com tampão de transferência 1 X concentrado;
- Fechar o sistema e ligar os cabos de acordo com as cores.

Polo + VERMELHO

Polo - PRETO

- Transferir por 2 horas a 100 V;
- Retirar as membranas dos sanduíches e congelá-las a -20°C ou prosseguir para os protocolos de imunomarcação.

ANEXO 11. Protocolo para imunomarcação de actina por western blot

Anticorpo: Actina (I-19) (Santa Cruz, sc-1616)

Produzido em: goat

Temperatura de estoque: 4°C

Massa molecular da proteína: 43 kDa

1. BLOQUEIO

- **Solução:** TBST/ 5% BSA
- **Duração:** 1 hora
- **Temperatura:** temperatura ambiente

2. ANTICORPO PRIMÁRIO

- **Solução:** TBST/ 5% BSA/ 0,1% azida sódica
- **Diluição:** 1:100

- **Duração e Temperatura:** 2 horas à temperatura ambiente

3. LAVAGENS

- **Solução:** TBST
- **Número de lavagens:** 3
- **Duração:** 5 minutos

4. ANTICORPO SECUNDÁRIO

- **Anticorpo:** HRP-anti-goat (Invitrogen, 611620)
- **Produzido em:** rabbit
- **Solução:** TBST/ 5% BSA/
- **Diluição:** 1:3000
- **Duração e Temperatura:** 1 hora à temperatura ambiente

5. LAVAGENS

- **Solução:** TBST
- **Número de lavagens:** 3
- **Duração:** 10 segundos

6. REVELAÇÃO

- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, 34087) (reagentes misturados na proporção 1:1 na hora de usar)

7. DESMARCAÇÃO

- **H₂O:** 5 minutos
- **NaOH:** 10 minutos
- **H₂O:** 5 minutos

ANEXO 12. Protocolo para imunomarcação de AKT por western blot

Anticorpo: AKT 1/2/3 (H-136) (Santa Cruz ,sc-8312)

Produzido em: rabbit

Temperatura de estoque: 4°C

Massa molecular da proteína: 56-62 kDa

1. BLOQUEIO

- **Solução:** TBST/ 5% BSA
- **Duração:** 1 hora
- **Temperatura:** temperatura ambiente

2. ANTICORPO PRIMÁRIO

- **Solução:** TBST/ 5% BSA/ 0,1% azida sódica
- **Diluição:** 1:100
- **Duração e Temperatura:** 4 horas à temperatura ambiente

3. LAVAGENS

- **Solução:** TBST
- **Número de lavagens:** 3
- **Duração:** 5 minutos

4. ANTICORPO SECUNDÁRIO

- **Anticorpo:** HRP-anti-rabbit (Santa Cruz, sc-2004)
- **Produzido em:** goat
- **Solução:** TBST/ 5% BSA/
- **Diluição:** 1:5000
- **Duração e Temperatura:** 1 hora à temperatura ambiente

5. LAVAGENS

- **Solução:** TBST
- **Número de lavagens:** 3
- **Duração:** 10 segundos

6. REVELAÇÃO

- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, 34087) (reagentes misturados na proporção 1:1 na hora de usar)

7. DESMARCAÇÃO

- **H₂O:** 5 minutos
- **NaOH:** 10 minutos

- **H₂O:** 5 minutos

ANEXO 13. Protocolo para imunomarcação de p-AKT por western blot

Anticorpo: p-AKT 1/2/3 (Ser 473) (Santa Cruz ,sc-33437)

Produzido em: rabbit

Temperatura de estoque: 4°C

Massa molecular da proteína: 56-62 kDa

1. BLOQUEIO

- **Solução:** TBST/ 5% BSA
- **Duração:** 1 hora
- **Temperatura:** temperatura ambiente

2. ANTICORPO PRIMÁRIO

- **Solução:** TBST/ 5% BSA/ 0,1% azida sódica
- **Diluição:** 1:100
- **Duração e Temperatura:** “overnight” a 4°C

3. LAVAGENS

- **Solução:** TBST
- **Número de lavagens:** 3
- **Duração:** 5 minutos

4. ANTICORPO SECUNDÁRIO

- **Anticorpo:** HRP-anti-rabbit (Santa Cruz, sc-2004)
- **Produzido em:** goat
- **Solução:** TBST/ 5% BSA/
- **Diluição:** 1:5000
- **Duração e Temperatura:** 1 hora à temperatura ambiente

5. LAVAGENS

- **Solução:** TBST
- **Número de lavagens:** 3
- **Duração:** 10 segundos

6. REVELAÇÃO

- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, 34087) (reagentes misturados na proporção 1:1 na hora de usar)

7. DESMARCAÇÃO

- H₂O: 5 minutos
- NaOH: 10 minutos
- H₂O: 5 minutos

ANEXO 14. Protocolo para imunomarcção de β -catenina por western blot

Anticorpo: β -catenina (Millipore, 06-734)

Produzido em: rabbit

Temperatura de estoque: 4°C

Massa molecular da proteína: 92 kDa

1. BLOQUEIO

- **Solução:** TBST/ 5% BSA
- **Duração:** 1 hora
- **Temperatura:** temperatura ambiente

2. ANTICORPO PRIMÁRIO

- **Solução:** TBST/ 5% BSA/ 0,05% azida sódica
- **Diluição:** 1:1000
- **Duração e Temperatura:** “overnight” a 4°C

3. LAVAGENS

- **Solução:** TBST
- **Número de lavagens:** 3
- **Duração:** 5 minutos

4. ANTICORPO SECUNDÁRIO

- **Anticorpo:** HRP-anti-rabbit (Santa Cruz, sc-2004)
- **Produzido em:** goat

- **Solução:** TBST/ 5% BSA/
- **Diluição:** 1:5000
- **Duração e Temperatura:** 1 hora à temperatura ambiente

5. LAVAGENS

- **Solução:** TBST
- **Número de lavagens:** 3
- **Duração:** 10 segundos

6. REVELAÇÃO

- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, 34087) (reagentes misturados na proporção 1:1 na hora de usar)

7. DESMARCAÇÃO

- **H₂O:** 5 minutos
- **NaOH:** 10 minutos
- **H₂O:** 5 minutos

ANEXO 15. Protocolo para imunomarcção de N-caderina por western blot

Anticorpo: N-caderina (K-20) (Santa Cruz, sc-31030)

Produzido em: goat

Temperatura de estoque: 4°C

Massa molecular da proteína: 130 kDa

1. BLOQUEIO

- **Solução:** TBST/ 5% BSA
- **Duração:** 1 hora
- **Temperatura:** temperatura ambiente

2. ANTICORPO PRIMÁRIO

- **Solução:** TBST/ 5% BSA/ 0,1% azida sódica
- **Diluição:** 1:200
- **Duração e Temperatura:** 4 horas à temperatura ambiente

3. LAVAGENS

- **Solução:** TBST
- **Número de lavagens:** 3
- **Duração:** 5 minutos

4. ANTICORPO SECUNDÁRIO

- **Anticorpo:** HRP-anti-goat (Invitrogen, 611620)
- **Produzido em:** rabbit
- **Solução:** TBST/ 5% BSA/
- **Diluição:** 1:3000
- **Duração e Temperatura:** 1 hora à temperatura ambiente

5. LAVAGENS

- **Solução:** TBST
- **Número de lavagens:** 3
- **Duração:** 10 segundos

6. REVELAÇÃO

- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, 34087) (reagentes misturados na proporção 1:1 na hora de usar)

7. DESMARCAÇÃO

- **H₂O:** 5 minutos
- **NaOH:** 10 minutos
- **H₂O:** 5 minutos

ANEXO 16. Protocolo para imunomarcção de α -SMA por western blot

Anticorpo: α -SMA (do inglês, *alpha-Smooth Muscle Actin*) (Sigma-Aldrich, A5228)

Produzido em: mouse

Temperatura de estoque: -20°C

Massa molecular da proteína: ~42 kDa

1. BLOQUEIO

- **Solução:** TBST/ 5% BSA
- **Duração:** 1 hora
- **Temperatura:** temperatura ambiente

8. ANTICORPO PRIMÁRIO

- **Solução:** TBST/ 5% BSA/ 0,1% azida sódica
- **Diluição:** 1:1000
- **Duração e Temperatura:** “overnight” a 4°C

9. LAVAGENS

- **Solução:** TBST
- **Número de lavagens:** 3
- **Duração:** 5 minutos

10. ANTICORPO SECUNDÁRIO

- **Anticorpo:** HRP-anti-mouse (BD, 554002)
- **Produzido em:** goat
- **Solução:** TBST/ 5% BSA/
- **Diluição:** 1:2000
- **Duração e Temperatura:** 1 hora à temperatura ambiente

11. LAVAGENS

- **Solução:** TBST
- **Número de lavagens:** 3
- **Duração:** 10 segundos

12. REVELAÇÃO

- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, 34087)
(reagentes misturados na proporção 1:1 na hora de usar)

13. DESMARCAÇÃO

- **H₂O:** 5 minutos
- **NaOH:** 10 minutos
- **H₂O:** 5 minutos

ANEXO 17. Protocolo para Zimograma em gelatina por SDS-PAGE

OBS: TODAS as soluções para eletroforese devem ser feitas com água Mili-Q, para evitar contaminações proteicas!

- **Tampão de amostra 5X []:**

- ✓ Tris-HCl 1,5 M (pH 6,8) ----- 1 mL
- ✓ Glicerol ----- 2,5 mL
- ✓ SDS ----- 0,5 g
- ✓ Água Milli-Q ----- 1,5 mL
- ✓ Azul de bromofenol ----- uma “pitada”

- **Tris-HCl 1,5 M pH 6,8**

- ✓ Tris base ----- 0,908 g
- ✓ HCl puro ----- 592 µL
- ✓ Água Milli-Q ----- 4,4 mL

- **Gelatina:**

Fazer uma solução mãe de Gelatina a 10mg/ml:

10mg ----- 1ml

X ----- 3ml

X = 30mg ou 0,030g em H₂O mili-Q

Incubar a 37°C até dissolver!

- **Tris HCl 1,5M com SDS 0,4% pH 8,8:**

Para preparar uma solução de 50 ml:

- ✓ Tris base ----- 9,086 g
- ✓ SDS ----- 0,2 g
- ✓ HCL puro ----- 1,07 mL
- ✓ Água Milli-Q ----- 49 mL

Conferir o pH!

- **Tris HCl 0,5M com SDS 0,4% pH 6,8:**

Para preparar uma solução de 50 mL:

- ✓ Tris base ----- 3,029 g
- ✓ SDS ----- 0,2 g
- ✓ HCL puro ----- 1,97 mL
- ✓ Água Milli-Q ----- 48 mL

Conferir o pH!

- **Coomasie brilliant blue R-250 0,5%:**

Para 200 ml:

- ✓ Coomasie brilliant blue R-250 – 1g
- ✓ Metanol ----- 60ml
- ✓ Ácido acético glacial ----- 20ml
- ✓ Água Milli-Q ----- 120ml

- **Tampão superior (5X concentrado) – BANCADA pH 8,3**

- ✓ Glicina----- 17,88g
- ✓ SDS----- 1,25g
- ✓ Tris----- 3,75g
- ✓ HCL puro ----- 1 mL
- ✓ H2O Mili-Q----- 250mL

Conferir o pH!

- **Tampão inferior (5X concentrado) – GELADEIRA pH 8,3**

- ✓ Tris base ----- 30,3 g
- ✓ HCl puro ----- 8,2 mL
- ✓ H2O Mili-Q ----- 1 L

Conferir o pH!

OBS: pode ser reutilizado até 3X, mas sempre **acertar o pH antes de usar!**

- **Acrilamida 30% - GELADEIRA**

OBS: TÓXICO enquanto pó e líquido!!!

- ✓ Acrilamida----- 7,5g
- ✓ Bis-acrilamida----- 0,2g
- ✓ H2O Mili-Q----- 25mL

OU

- ✓ Acrilamida 40% ----- 18,75 mL
- ✓ Bis-acrilamida----- 0,2g
- ✓ H2O Mili-Q----- 6,25 mL

- **Triton X-100 (2,5%) – BANCADA**

- ✓ Triton X-100 (100%)----- 5mL
- ✓ H2O Mili-Q----- 195mL

- **Preparo do Gel**

OBS: Lavar os materiais antes e passar álcool 70%!!!

1º) Gel de Corrida - Gel com 8% de acrilamida e 1 mg/mL de gelatina!

	1 gel	2 géis
Acrilamida 30%	3,3 ml	4 mL
H ₂ O milli-Q	3,0 ml	5,5 mL
Tris 1,5M pH 8,8 e 0,4% de SDS	2,5 ml	3,75 mL
Gelatina 10mg/ml	1,0 ml	1,5 mL
OBS: solubilizar a 37°C antes!		
TEMED	10 µl	15 µL
APS	100 µl	150 µL
Volume Total	10 ml	15 mL

Jogar a água e secar com papel filtro.

Para a montagem dos vidros posicionar o vinco da linha branca para cima (OBS: pode passar vaselina no contorno dos vidros se estiver vazando ou vedar com parafilm). Na montagem do sistema posicionar a abertura do vidro para dentro, alinhar bem os dois vidros e prender no suporte. Colocar vidros dos dois lados do sistema (mesmo se só fizer um gel). Colocar sobre o silicone e prender os pinos. Testar com H₂O se está vazando.

Após o preparo da solução gel, verificar se não está quente e colocar 5 mL entre os vidros, completar com metanol para tirar as bolhas. Quando polimerizar, descartar o metanol, lavar 1X com água e adicionar o gel de entrada.

OBS: se fizer apenas um gel, usar aparato de acrílico do outro lado ou fazer uma base de gel de corrida no outro vidro para evitar vazamento de tampão!

2º) Gel de Entrada

	1 gel	2 géis
Acrilamida 30%	0,75 mL	1,5 mL
H ₂ O milli-Q	3,15 mL	6,3 mL
Tris 0,5M pH 6,8 e 0,4% de SDS	570 µL	1,14 mL
TEMED	7,5 µL	15 µL
APS	75 µL	150 µL
Volume Total	4,65 mL	9,1 mL

Adicionar o gel de entrada sobre o gel de corrida e colocar o pente até ~1 cm acima do limite entre os géis. Cobrir o sistema com uma papel toalha úmido para evitar ressecamento do gel de um dia para outro.

- Adicionar nos poços do gel 40 µL do sobrenadante da cultura celular já diluído em tampão de amostra não redutor (1X [] no final).

OBS: não usar os poços das extremidades, pois corre torto!!!

- Adicionar 10 µL de padrão de peso

molecular misturado com 30 μL de tampão de amostra 1X [] no segundo poço do gel.

- Nos poços que ficarem sem amostra (inclusive os das extremidades) colocar 40 μL de tampão de amostra 1X []!
- Colocar tampão superior 1X [] entre os géis (150 mL), com cuidado para não entrar no gel! Preencher o volume dos poços com tampão superior e depois encher o compartimento central com o mesmo tampão.
- Adicionar tampão inferior na parte de fora (800 mL).
- Fechar o sistema e ligar os cabos de acordo com as cores.

Polo + VERMELHO

Polo - PRETO

- Colocar o sistema num recipiente com gelo!!!
- Correr o gel por 4 horas a 40 mA.

OBS: se estiver fazendo bolhas é porque está correndo.

Enquanto faz a corrida, preparar o tampão de incubação...

- **Tampão de Incubação:** (0,05M TrisHCl pH 8,0, 100 mM CaCl_2 e 1 μM ZnSO_4)

✓ Tris base ----- 1,21g

✓ CaCl_2 ----- 2,22 g

OU

✓ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ----- 2,93 g

✓ ZnSO_4 ----- 200 μl (Solução mãe de 1mM) - GELADEIRA

✓ Água milli-Q ----- 199,33 ml

✓ HCl puro ----- 380 μL

Conferir o pH!

- Retirar o gel do sistema de corrida e lavá-lo 2X com H_2O
- Lavar 3X de 10 minutos cada com Triton X-100 (2,5%) com um volume de 50 ml por lavagem em agitador
- Lavar 3X de 1 minuto cada com H_2O ou até sair toda a espuma
- Incubar os géis em Tampão de Incubação (0,05M TrisHCl pH 8,0, 10 mM CaCl_2 e 1 μM ZnCl_2) por 72 horas em recipiente fechado (p/ não perder água por evaporação) em incubadora a 37°C.

OBS: A atividade das metaloproteinases depende dos íons Ca^{+2} e Zn^{+2} , mas a molaridade desses íons não pode exceder o indicado acima, o que poderia levar a

inibição dessas proteínas (Ambili M & Sudhakaran PR . Journal of Cellular Biochemistry 73:218-226,1999)

- Corar o gel com 0,5% de Coomassie Brilliant Blue R-250 por 30 minutos (aproximadamente 40 mL por gel) a temperatura ambiente no agitador.

OBS: cortar as bandas do padrão de peso molecular antes de corar, pois não é possível identifica-los após corados!!!

- Lavar o gel com H₂O até visualizar as bandas.
- Armazenar o gel em H₂O (Pode ser armazenado a temperatura ambiente, porém há risco do gel inchar com a água).
- Escanear os géis em scanner de géis no mesmo dia.

ANEXO 18. Protocolo para ensaio de formação de colônias em alginato

Terminado o tempo de tratamento das células em placas de 6 poços:

- Retirar o sobrenadante e adicionar 1 mL de DMEM com 10% de SFB;
- Soltar as células com rodinho;
- Contar as células e preparar solução de cada amostra que contenha 2500 células em 500 µL de DMEM com 10% de SFB e 10% de Firming Buffer;
- Transferir a solução de cada amostra para a placa do AlgiMatrix 3D Culture System (Gibco, 12684);
- Centrifugar a placa a 100g por 4 minutos para que as células sejam inseridas na matrix;
- Adicionar 500 µL por poço de DMEM com 10% de SFB;
- Incubar a placa a 37°C e 5% de CO₂ por 6 dias para formação das colônias.

OBS: Trocar o meio no terceiro dia!!!

Passados 6 dias:

- Lavar os poços 1 X com DMEM sem SFB;
- Fixar com PFA 1% em DMEM overnight a 4°C;
- Corar com 1 mL de solução de cristal violeta 0,25 mg/mL em H₂O por 1 hora sob agitação;
- Lavar 3 X de 30 minutos cada com H₂O sob agitação;

- Posicionar a matriz de alginato de cada amostra em uma placa de petri com grade de 2 mm no fundo;
- Fotografar cada um dos 4 quadrantes da amostra com auxílio de uma lupa em aumento de 2X vezes;
- Contar as colônias com área maior que 0,009 mm² em cada quadrante usando o programa ImageJ.

ANEXO 19. Protocolo para ensaio de proliferação celular por coloração com cristal violeta

- Remover o meio de cultura
- Lavar uma vez com PBS 37°C
- Adicionar 50µl de Cytofix (ou paraformaldeído 1% em PBS) e incubar por 30min em gelo (ou temperatura ambiente, no caso do Paraformaldeído)
- Remover o Cytofix e adicionar 100 µl de solução de cristal violeta 0,25mg/ml em H₂O
- Incubar por 10min à temperatura ambiente
- Remover a solução de cristal violeta
- Lavar 2x com 150µl de dH₂O (120µl/poço)
- Adicionar 100µl de ácido acético 33% em H₂O
- Incubar por 30min à temperatura ambiente num agitador
- Ler em leitor de microplacas em comprimento de onda de 570nm.

ANEXO 20. Protocolo para marcação celular com anexina V e 7AAD

Seguir a instruções do PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen, 559763).

Em gelo...

- Retirar o sobrenadante dos poços e colocar em tubos de citômetro identificados;
- Lavar os poços com PBS a 37°C duas vezes, reservando o conteúdo da primeira lavagem junto ao sobrenadante de cada poço;
- Adicionar 300 µL/poço de 0,05% de tripsina-EDTA e incubar a 37°C por 3 minutos;
- Juntar as células soltas aos seus respectivos sobrenadantes;
- Lavar duas vezes com PBS gelado, centrifugando os tubos a 1800 rpm por 3 minutos entre as lavagens;

- Descartar o sobrenadante;
- Ressuspender em 100 μ L de *Binding Buffer 1X*;
- Incubar com 5 μ L de PE-anexina V e 5 μ L de 7AAD/tubo por 15 minutos no escuro e **temperatura ambiente**;
- Adicionar 400 μ L/tubo de *Binding Buffer 1X*;
- Passar no citômetro imediatamente (**manter em gelo**).

ANEXO 21. Protocolo para quantificação de ácido hialurônico no sobrenadante das culturas celulares

Para degradação das proteínas:

- Descongelar o 1 mL do sobrenadante da cocultura congelado a -20°C
- Adicionar 1 mL da solução:
 - Protease maxatase 6 mg/mL
 - Tris-HCl 0,05 M
 - NaCl 0,15 M
 - **pH 8,0**
- Deixar “overnight” em banho-maria a 56°C
- Ferver as amostras por 20 minutos
- Deixar esfriar e congelar.

Para quantificação do ácido hialurônico:

- Adicionar à placa de ELISA 100 μ L/poço de solução contendo a sonda diluída em tampão carbonato e incubar por 18 horas a 4°C

Tampão carbonato:

- NaHCO₃ 0,06 M
 - Azida sódica 0,5 g/L
 - pH 9,6
- Lavar a placa 5X com tampão de lavagem

Tampão de lavagem:

- Tris-HCl 0,05 M
 - pH 7,75

- Adicionar 100 μL de soluções padrão de diferentes concentrações de ácido hialurônico (0-500 ng/mL) diluídas em tampão de ensaio ou 100 μL das amostras experimentais

Tampão de ensaio:

- Tris-HCl 0,05 M
 - BSA 1%
 - pH 7,75
- Incubar a 4°C por 12 horas
- Lavar 3X com tampão de lavagem
- Adicionar 100 μL de sonda biotinilada (1 mg/mL) diluída 1:10000 em tampão de ensaio
- Agitar por 2 horas
- Lavar 5X com tampão de lavagem
- Para a revelação adicionar 100 μL de streptavidina conjugada com europium diluída 1:10000 em tampão de ensaio
- Agitar por 30 minutos
- Lavar 5X com tampão de lavagem
- Solubilizar o europium com 100 μL de solução de DELFIA Enhancement Solution (1244-104 – PerkinElmer) sob agitação por 5 minutos
- Ler o europium livre de cada poço em fluorímetro Victor 2 (PerkinElmer-Wallac®) (excitação 340nm e emissão a 615nm)
- Comparar os valores experimentais com a curva padrão de ácido hialurônico para determinação da concentração dessa molécula em cada amostra
- Normalizar os valores obtidos de concentração de ácido hialurônico pela quantidade de proteínas celulares (quantificadas usando kit BCA) das respectivas amostras.